

1980/97

10552

Keresztkötéses mikrorészecskék és felhasználásuk gyógyászati célú hordozóként

ANDARIS LIMITED, Nottingham, Nagy Britannia

A bejelentés napja: 1997. 06. 12.

A nemzetközi bejelentés napja: 1995. 12. 14.

száma: PCT/GB95/02925

Az Európa bejelentés elsőbbsége: 1994. 12. 16.

száma: 94309417.7

KIVONAT

A találmány sima felszínű, 0,1 - 50 μm átmérőjű gömbalakú mikrorészecskékből álló steril por. Jellegzetessége, hogy a mikrorészecskék hidrofílek és monodiszperz szuszpenzióvá képesek rekonstituálódni vízben, s e mikrorészecskék még valamilyen élettanilag vagy diagnosztikailag aktív komponenst is tartalmaznak, amely közvetlenül vagy közvetve kapcsolódik a mikrorészecskékhez a rajtuk levő szabad funkciós csoportok révén.

1980/97

10550

(1997.VI.)

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A

Képviselő: ADVOPATENT Szabadalmi Iroda, Budapest

~~1997 JUN 12~~

Keresztkötékes mikrorészecskék és felhasználásuk gyógyászati célú hordozóként

ANDARIS LIMITED, Nottingham, Nagy Britannia

Feltalálók:

Andrew Derek SUTTON, Grantham, Nagy Britannia

Richard Alan JOHNSON, Nottingham, Nagy Britannia

A bejelentés napja: 1997. 06. 12.

A nemzetközi bejelentés napja: 1995. 12. 14.

száma: PCT/GB95/02925 -

Az Európa bejelentés elsőbbsége: 1994. 12. 16.

száma: 94309417.7

A találmány keresztkötéses mikrorészecskékre és azok gyógyászati célú hordozóként való felhasználására vonatkozik.

A mikrorészecskés hordozó rendszereknek a gyógyászati és diagnosztikai hatóanyagok parenterális bevitelére történő alkalmazását egyre fokozottabb figyelem övezi. A mikrorészecskéket felhasználó technológiai rendszerek és a gyártásuk alapjául szolgáló kémiai megoldások egész légióját javasolták már a szakirodalomban abból a célból, hogy a hatóanyagok szubkután, intravénás, intraartériás bevitelére megfelelő hordozóanyagok álljanak rendelkezésre. Az "ideális hordozóanyagnak" több kulcsjellemzője van. Ezek magukba foglalják a méretet, a méreteloszlást, a hasznos (ható)anyag tartalmat, a biológiai lebontás ütemét, a használat könnyűségét, a hatóanyagfelszabadulás kinetikáját és a méretnövelhető, reprodukálható gyártás lehetőségét. Ezen "ideális hordozóanyag" egyes egyedi vonatkozásainak, jellemzőinek, nevezetesen a gyógyszerhatóanyag-tartalomnak, a biológiai lebontás ütemének és részben a méretnek és a méreteloszlásnak a kérdésével már sikeresen foglalkoztak más szerzők.

Az ismert hordozóanyagok gyártásánál ezidáig különféle, főként oldószeres és emulziós alapú technikákat alkalmaztak. E módszereknek az az egyik hátránya, hogy a hordozóanyagok gyártásának egy vagy két lépésében kísérelték meg magának a hordozóanyag kulcsfontosságú elemeinek a kézbe tartását, ellenőrzését. Így a méret, a méreteloszlás, a gyógyszerhatóanyag-tartalom és a biológiai lebontás üteme, mint jellemző paraméter, mind egyazon dinamikus gyártókörnyezetben, az egyszeres és kettős emulziós rendszerek vagy az oldószer elgőzölögtetési technikák által tipikusan meghatározott körülmények között alakult

ki. Az emulziós eljárásokra jellemzően, a gyógyszerhatóanyagnak, a polimernek és a határfelületet módosító szereknek az oldatát összekeverték valamilyen az előzővel nem elegyedő oldószerrel, emulziót képeztek, hevítés útján vagy más módon stabilizálták a részecskéket, majd a felszínüket letisztították, hogy a parenterális alkalmazással összeférhetetlen oldószermaradékot, olajokat eltávolítsák.

A korábbról ismert technikák esetében az emulziós vagy az oldószer-elgőzöltetős rendszereknél használt reakcióedény döntő fontosságú jellemző. A mikrorészecske-morfológia kontrollját oly módon biztosítják a reakcióedényen belül, hogy egyensúlyt hoznak létre az olajos és vizes komponensek felületi erői és az oldott anyag határfelületi kölcsönhatása között, valamint a mechanikai behatások, például a keverés, a hőközlés és a héjképződés, továbbá természetesen a hatóanyagnak a polimer mátrixba való beépülése között. Mindazonáltal e technológiák nagymértékben inkompatibilisak a parenterális gyógyszerkészítmények gyártása során alkalmazott nagyüzemi módszerekkel.

A részecskeméret és a méreteloszlás kontrollálhatósága az ismert mikrorészecskék esetében - majdnem kivétel nélkül - jóval gyengébb volt annál, mint amit a WO-A-9112823, a WO-A-9218164 és a WO-A-9408627 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásokban ismertetett porlasztva szárításos technikákkal el lehetett érni, amidőn az echokontrasztos leképezés és más potenciális parenterális felhasználások céljára állítottunk elő mikrorészecskéket. Az intravénás mikrorészecskék akut toxicitása nagy mértékben összefügg a pulmonáris keringésben előidézhető hajszálér-blokáddal, a pulmonáris vénás vérnyomás egyidejű csökkenéséhez társul és a beteg azon hajlandóságának elvesztését okozza, hogy kövesse az orvos utasításait. A részecskeméret és a LD toxicitás közötti összefüggés jól dokumentált. A mi saját mérési adataink is azt mutatják, hogy

az iv részecskék toxicitása meredeken nő, amint az átlagos részecskeméret meghaladja a 6 μm -t, a nem-deformálható mikrorészecskék számára a tüdőszövetben rendelkezésre álló kapillárisok feltételezett méretét.

Jellemzően minél nagyobb a kapszulák átlagmérete, szignifikánsan annál szélesebb a méreteloszlási görbe, s a mikrorészecskék mérettartománya így két nagyságrendet is átfoghat. Terápiás felhasználásra, így kemoembolizáció céljából, az az elképzelés, hogy olyan mikrorészecskéket tartalmazó készítményt injektózzanak be, amelyben 5 μm -tól 100 μm -ig terjedő mérettartományba eső mikrorészecskék vannak, nagymértékben összeférhetetlen a területileg célzott gyógyszerbevitel koncepciójával. A szóbanforgó mérettartomány felső szélén a 100 μm -es vagy annál nagyobb méretű részecskénél megvan az esélye a főbb véredények embóliás elzáródásának, ami nagy kiterjedésű testszövetek rossz vérellátottság miatti elhalásának a veszélyével jár együtt. Másfelől a tartomány alsó szélénél található az a részecskeméret, amelynél a hatóanyag szisztémikus szétoszlása a szervezetben tulajdonképpen lehetővé válik.

Az a mechanizmus, amelynek segítségével az időben elnyújtott hatóanyagfelszabadulást a mikrorészecske rendszerekben az eddigiek során a legtöbbször elérték, a mátrix eróziójának s a beágyazott vagy felszívott hatóanyagnak a környező közegbe történő felszabadulásának ellenőrzött volta révén valósult meg. A hatóanyag(ka)t vagy a részecske előállításakor dolgozták abba bele, vagy a részecske rögzítését illetve stabilizálását követően annak mátrixával felszívatták.

A gyógyszerhatóanyagok bedolgozása az ismert mikrokapszulák mátrixába víz - és elkerülhetetlenül oxigén - jelenlétében történő hőkezelést kívánt meg. Ez csaknem bizonyosan a gyógyszerhatóanyag károsodásához vezet az oxidatív

Egy másik mechanizmus, melynek segítségével az oldható polimer hordozókból a gyógyszerhatóanyag felszabadulásának ütemét lassítani, módosítani lehetett, a hatóanyagnak az oldható hordozóhoz kovalens kötésekkel történő hozzákapcsolása volt. E módszer általában nem nyert alkalmazást a mikrorészecskés rendszereknél, ahol a gyógyszerek, a ligandumok vagy az antitestek közvetlenül az egyes meghatározott hordozóanyagokhoz kapcsolódnak.

A mikrokapszulák biológiai lebontásának sebességét nagyrészt a keresztkötések mértéke szabja meg. A technika állásához tartozó rendszerekben a keresztkötésesség mértéke megváltoztatásának igen negatív hatása volt a gyógyszerhatóanyag felvételére és azt követően a mikrorészecske képzési képességre. Kevés erőfeszítést tettek korábban arra, hogy megkíséreljék ennek a paraméternek a manipulálását a biológiai lebomlás ütemének és gyógyszer felszabadulásának kézbentartása végett.

A technika állása szerinti mikrorészecskék jelentős mennyiségű felületaktív anyag vagy ultrahangos szonikálás alkalmazását kívánják meg annak érdekében, hogy vizes közegben monodiszperz szuszpenzió jöjjön létre. Még a rekonstituált mikrorészecskék esetében is ez a helyzet; azoknak hajlamuk van az agglomerálódásra és ennél fogva az ilyen mikrorészecskéket tartalmazó készítmények hipodermikus tűkkel történő bőr alá injekciózása problematikus.

A jelen találmány azon a felfedezésen alapszik, hogy az olyan típusú mikrorészecskék, mint amelyeket a WO-A-9112823, WO-A-9218164 és WO-A-9408627 közzétett PCT szabadalmi leírásokban ismertettek, jó jellemzőkkel rendelkeznek és még a hőkezelés hatására bekövetkezett keresztkötés-képzés után is képesek megtartani hidrofíl tulajdonságaikat, a vízben való rekonstitúció és a monodiszperz szuszpenzió képzésének képességét. Ezen túlmenően az olyan funkciós csoportok mint a kiindulási anyag karboxil-, amino-, hidroxil- vagy szulfhidril-
-csoportjai megőrzik aktivitásukat és így a derivatizálási reakciókban felhasználhatók.

A találmányunk szerinti sima felszínű, gömbalakú, $0,1\ \mu\text{m}$ - $50\ \mu\text{m}$ átmérőjű, keresztkötéseket tartalmazó anyagú mikrorészecskékből álló steril por, hidrofíl tulajdonságú és vízben rekonstituálódni képes monodiszperz szuszpenziót alkotva. Ez a mikrorészecskékből álló por valamilyen élettanilag hatásos vagy diagnosztikailag aktív komponenst is magába foglal, amely a mikrorészecskékhez közvetve vagy közvetlenül kötődik a rajtalevő szabad funkciós csoportok, például amino-, hidroxil-, karboxil- vagy szulfhidrilcsoportok révén.

Találmányunk célszerűen alkalmazza azokat a mikrorészecske-előállítási technikákat, amelyeknek leírása a fentemlített közzétett PCT szabadalmi leírásokban

található meg (s amelyek tartalmára hivatkozás formájában utalunk a jelen leírásszövegben); ezeknek a technikáknak köszönhető az olyan paraméterek mint a részecskeméret, a méreteloszlás, a hatóanyagtartalom, a biológiai lebomlási ütem és a hatóanyag-kibocsátási kinetika szűk határok közötti kézbentartása, ami biztosítja a használat könnyűségét és a gyártás méretnövelésének lehetőségét. A jelen találmány szerinti mikrorészecskéket az adott alkalmazásnak megfelelően lehet kialakítani, miközben minden esetben megmarad annak a lehetősége, hogy a hatóanyaggal feltöltött hordozóanyagot a gyógyszeripari nagyüzemi gyakorlatnak megfelelő léptékben lehessen előállítani a gyártásellenőrzés ugyanazon színvonalával mellett. A részecskeméret ellenőrzésén túlmenően egyes individuális gyártási lépésekben külön, független ellenőrzési lehetőség van a méreteloszlás vonatkozásában; a fixálás ütemét tekintve vagy megfordítva a biológiai lebomlás ütemét illetően; a gyógyszer hatóanyagtartalmára nézve; és a formázás, kikészítés során. Amint a fentebb említett korábbi PCT szabadalmakban ismertetésre került, a bejelentők olyan eljárással rendelkeznek, amely a kívánt természetű mikrorészecskék előállítására képes, s a teljes méretskálán gyártható. Az eljárás a gyógyszerészeti szabványoknak megfelelően kivitelezhető anélkül, hogy idegen részecskék beeresztésére sor kerülne, ami majdnem biztosan kizárná a legtöbb, a technika állása szerinti eljárásokkal gyártott mikrorészecskék parenterális alkalmazását.

A jelen találmány mikrorészecskés készítmények előállítására vonatkozik, amelyek intravénásan, intraartériásan és *ex vivo* alkalmazhatók. Az intravénás felhasználású részecskeszuszpenziók, az oldószerben történő rekonstitúciót követően, a részecskék térfogatát tekintve előnyösen kevesebb mint 5 % 6 μm -nél nagyobb részecskét tartalmaznak. A méreteloszlás továbbá közelítőleg Gauss-görbe

alakú, úgy hogy a részecskék mintegy 50 %-a az 5 μm -es tartományon belül van, előnyösen 3 μm -en belül, még kedvezőbben 2 μm és a legkedvezőbb esetben 1,2 μm -es értéken belül. A kívánatos eloszlás esetén a részecskék 80 %-a egy 3 μm -es tartományon belül van. (Minden eloszlást vagy egy térfogat-, vagy egy tömegbázis szerintinek kell tekinteni.) A találmány egyik előnyös kiviteli alakját az olyan porok képezik, amelyekben a részecskék 95 %-a kisebb 6 μm -nél és 80 %-uk az 1 - 6 μm tartományban van; különösen intravénás alkalmazás célszerű ilyeneket használni. Egy másik előnyös kiviteli alak az olyan por, amelyben a részecskék 90 %-a kisebb mint 20 μm és kevesebb mint 5 %-a kisebb 6 μm -nél; ez kimondottan intraartériás alkalmazás mellett célszerű.

Nagyobb részecskékből álló rendszereknél lehetőség van arra, hogy a nagyfokú ellenőrzés mellett végzett porlasztva szárítás és egy azt követő frakcionálási lépés kombinációjával elegendően nagyméretű s ugyanakkor szűk méreteloszlási tartományba eső mikrorészecskéket állítsunk elő, úgy hogy az artériába történt beadást követően a szisztémikus hatóanyagkibocsátás ki van küszöbölve és csak a 20 μm -nél kisebb átmérőjű véredények embolizálódnak.

Találmányunk egy másik kiviteli módja szerint a hatóanyagot a porlasztva szárításhoz használt törzsoldatba tettük bele és a művelet elvégzése után a mikrorészecskéket stabilizáltuk. Ennek a módszernek az előnye abban mutatkozott meg, hogy a korábbi eljárásokkal szemben a részecske morfológiát és a hatóanyagtartalmat sokkal jobban sikerül kézbe tartani.

A találmányban alkalmazott eljárásnak olyan kiviteli módja is lehetséges, mely szerint a mikrokapszula héjanyag leválasztása, ráakódása a gyógyszerhatóanyagra száraz por állapotban történik, amelynek a víztartalma elhanyagolható, s ez a por az eredeti oldható komponensekké képes rekonstituálódni.

A találmány értelmében a keresztkötések képzését fel lehet használni arra, hogy a hatóanyag kibocsátásának ütemét ellenőrizni, kézbe tartani lehessen. Például a találmány egy fogatosítási módja szerint, a keresztkötések mértékét és ennél fogva a lebomlás sebességét a hatóanyag hozzáadása előtt előzetesen beállítjuk. Az aktív ligandumot azután hozzákapcsolva egy olyan kontrollált hatóanyagkibocsátási görbét kapunk, amelynek jellegét a mátrix keresztkötésségének mértéke határozza meg. Az itt jelentkező előny abban áll, hogy állandó ütemű hatóanyagkibocsátás figyelhető meg a jólismert "burst"-effektus nélkül.

A jelen találmány további aspektusa a keresztkötés-képzés manipulálása. A származékképzésre alkalmas csoportok potenciális szintje és a keresztkötések képződéséhez szükséges hőmérséklet/idő különböző adalékok hozzáadása révén szabályozható, melyek e paramétereket módosítják. Lizinnek vagy polilizinnek, glutamátnak vagy poliglutamátnak, fenilalaninnak és tirozinnak a bevitele a törzsoldatba azt eredményezheti, hogy a kész mikrorészecske készítmény biológiai lebomlásának üteme megnő vagy csökken. Ezen túlmenően ezeknek az adalékanyagoknak az alkalmazása jelentősen megnövelheti azoknak a potenciális funkciócsoportoknak a számát, amelyekhez a hatóanyagok kapcsolódhatnak. Ezenfelül az ilyen adalékanyagok használatával csökkenthető az az idő/hőmérséklet, amely mellett a mikrorészecskék stabilizációja megtörténik a porlasztva szárítás után képződött oldható mikrorészecskék hevítése közben.

A fentieknek megfelelően tehát a találmányunk olyan mikrorészecskék előállítását biztosítja, amelyek a szűk részecskeméret-eloszlásuknak köszönhetően különösen alkalmasak arra, hogy a gyógyszerhatóanyagot meghatározott helyekre

elszállítsák és ott leadják. A kívánatos tulajdonságok kombinációja következtében ezek a mikrorészecskék különösképpen kedvezőnek bizonyultak.

Azt találtuk, hogy a találmány szerinti technikákkal előállított mikrokapszuláknak különféle előnyös tulajdonságai vannak az eddig gyártottakéhoz képest a kezelhetőség, a derivatizálhatóság és a mikrorészecskék formulálása terén. Így például a bejelentő technológiája olyan mikrorészecskék előállítását teszi lehetővé, amelyek a másodlagos szerkezetüket jelentős mértékben megtartják s ezáltal a hidrofíl jellegüket is, ahelyett, hogy denaturálódnának és oldhatatlanná válnának a funkciós csoportjaikat elrejtve, hozzáférhetetlenné téve, amint az a korábbról ismert mikrorészecskéknél gyakori. A találmány szerinti mikrorészecskék közelebbről:

- (i) jelentős számban tartalmaznak a derivatizáció céljából hozzáférhető amino-, hidroxil- vagy karboxilcsoportokat vagy ezek kombinációit,
- (ii) erősen hidrofíl jellegűek, vizes közegben a funkciós csoportjaik teljesen hozzáférhetők a derivatizáció céljából,
- (iii) száraz vagy nedves állapotban úgy manipulálhatók, hogy végül olyan száraz készítmények jöjjenek létre, amelyeknél nem szükséges felület-aktív anyagok hozzáadása vagy ultrahangos kezelés (szonikálás) annak érdekében, hogy monodiszperz részecskeszuszpenziók keletkezzenek,
- (iv) biológiailag olyan ütemben bomlanak le s teszik szabaddá a hatóanyagot, amelyet az összetételük és a héj kereszt kötése ssége szab meg,
- (v) 0,01 μm -tól 100 μm -ig terjedő mérettartományba eső nagyságúak, és
- (vi) *in vivo* körülmények között lényegesen hosszabb ideig (60 percig vagy

tovább is) megmaradnak a keringésben, mint az ismert, inkább hidrofób tulajdonságú mikrorészecskék s mint a liposzómák; csökkent mértékű a falósejtek működésének serkentése s a trombogén potenciál minimális.

Intravénás alkalmazás esetén a részecskeméret célszerűen 4 μm alatti és intraartériás alkalmazásnál 8 μm és 30 μm között van. A frakcionálás - különösen a nagyobb méretű részecskék előállításánál - tetszőlegesen beiktatható plusz lépés. Ez a részecskeméret-tartomány úgy adható meg, mint amelyben az interkvartilis tartománynak a közepes részecskeátmérőhöz való viszonya 0,2 és 0,5 közötti.

A találmány szerinti mikrorészecskék derivatizálhatók gyógyszerhatóanyagoknak, ligandumoknak, peptideknek vagy fehérjéknek közvetlenül a hordozóhoz történő kapcsolása által, felhasználva ehhez az alapkapszula vagy a porlasztva szárítás során a törzsoldatba tett adalékok karboxil- vagy aminocsoportjait. A kapcsolat létrehozható például glutáraldehid, EDCI, tereftálsav-klorid, bróm-cián alkalmazásával vagy redukív aminálás segítségével. Alternatívaként jelenik meg az a lehetőség, hogy a ligandum, a gyógyszerhatóanyag, a fehérje vagy a peptid egy biológiailag lebontható hidroxisav-linkermolekulán át kapcsolódjék. Ilyenfajta linkermolekulát írnak le a WO-A-9317713 közzétételi számú PCT szabadalomban (Rijksuniversiteit Groningen), amelyre referenciaképpen utalunk.

A találmány egy további előnye abban áll, hogy száraz, steril por alakjában lehet a terméket előállítani.

A por formájú, találmány szerinti mikrokapszulák esetében nincs feltétlenül szükség arra, hogy felületaktív anyagokat alkalmazzunk a monodiszperz

szuszpenzió elérése céljából a rekonstitúció során. Ha már rekonstituálódtak, ezek a mikrokapszulák nem tapadnak össze és fecskendő segítségével a készítmény beadható.

A jelen találmány egyik vonása az, hogy biokompatibilis anyagokból vízzel kompatibilis rendszereket állítunk elő. Nem volt előre várható, hogy a találmány szerinti mikrorészecskéket hőkezeléssel úgy lehet oldhatatlanná tenni, hogy közben a másodlagos szerkezetük jelentős mértékben fennmarad és ez biztosítja erősen hidrofíl jellegüket. A másodlagos szerkezet fennmaradásának bizonyítékát a részecske izoelektromos pontjának (PI) vizsgálata révén nyertük, amely 4,5-5 közötti pH-értékeknél a natív albuminéhoz nagyon hasonló volt. Normális esetben az albumin teljes denaturációja az izoelektromos pont jelentős emelkedéséhez vezet, egészen a 6,5-7,0 értékekig.

Ezen túlmenően a mikrorészecskék fehérjeanyagának proteáz enzimekkel történő emésztése olyan peptideket eredményez, amelyeket ha a kiindulási oldható fehérjék emésztéséből származóakkal hasonlítunk össze, akkor közel azonos képet mutatnak a HPLC-analógjaik. Ráadásul a fehérjealapú mikrorészecskék valamint a kiindulási fehérjeanyag savas hidrolizátumai megdöbbszentően hasonló aminosav-összetételt mutatnak. Ez a két analízis alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a fehérje a mikrorészecskékben nagymértékben natív állapotú maradt.

A találmány szerinti részecskék hidrofíl tulajdonságúak és megvan az a képességük, hogy egy órát meghaladó időtartamig a keringésben maradjanak. Ezáltal elsőízben áll rendelkezésre egy olyan biokompatibilis hordozórendszer, amelynek a keringésben mutatott nyújtott élettartama mellett a ligandumok iránti fajlagos affinitása is magasfokú. A mikrorészecskéknek ez a fajlagossága a gyártás folyamán beállítható és nagy affinitású ligandumkötő képességet kölcsönöz e

részecskének, olyan fokú, amilyen a kromatográfiás mátrixok vagy az enzimek szoktak rendelkezni. A részecskék potenciális felhasználási területe a biológiai folyadékokkal érintkezésben például a testen kívül végrehajtott méregtelenítés, egyes biológiai vizsgálatok a vérszérumban vagy a vérben, és a vér egyes komponenseinek elkülönítése mielőtt annak a testbe való visszaömlésére sor kerül.

A következő példák a találmány illusztrálására szolgálnak.

1. példa

Ebben a példában az oldható mikrokapszulák fixálását mutatjuk be, miáltal oldhatatlan vagy kevésbé oldható mikrokapszulák képződnek a héj anyagának kialakuló keresztkötései révén. A mikrokapszulákban a keresztkötések különféle eljárásokkal alakíthatók ki, beleértve a hőkezelést és a kémiai ágensek behatását. A fixálás mértékének beállítása eredményezi azt, hogy azután mód nyílik a mikrokapszulák megfelelő közegben való oldhatósági fokának a beállítására is. Továbbmenőleg, ennél a kioldódási pontnál bármely megkötött vagy mikrokapszulába zárt hatóanyag felszabadul. Ezen felül a mikrokapszulák fixáltsági foka tükröződik annak a mértékében is, amennyire azok enzimatikusan emészthetők. Mennél nagyobb a fixáltsági fok, annál nagyobb ellenállást tanúsítanak a mikrokapszulák az enzimátikus emésztéssel szemben.

A HSA-mikrokapszulákat 150 ml, 25 % etanolt tartalmazó, 10,0 mg/ml HSA-tartalmú törzsoldat porlasztva szárításával állítottuk elő. Az alábbi 1. táblázatban részletesen bemutatjuk a mikrokapszulák porlasztva szárítással történő képzésénél alkalmazott reakciókörülményeket.

1. táblázat

Porlasztva szárítási kondíciók	Beállított érték
Belépő hőmérséklet	220 °C
Kilépő hőmérséklet - kezdetben	85,2 °C
Kilépő hőmérséklet - a végén	84,0 °C
Atomizációs nyomás	7,5 bar
Csillapítás beállítás	0,5
Betáplálási sebesség	3,88 g/perc
Betáplált törzsoldat összetétele	25% etanol, 100 mg/ml HSA

A porlasztva szárítási eljárással 17,21 g mikrokapszulát állítottunk elő. Az ebből az egyetlen sarzsból származó mikrokapszulákat egyenlő tömegű adagokra osztottuk és 175 °C-on hőkezeltük 45, 55 illetve 75 percen keresztül. A hőfixálási eljárás a porlasztva szárítási műveletből nyert oldható mikrokapszulákat oldhatatlanná teszi az albumin bizonyos szerkezeti aminosavai között keresztkötések létesítése révén. A három különböző ideig hőfixált mikrokapszulából mitát vettünk és a kapszulák méretét vizes közegben Multisizer II készülék (Coulter Electronics) segítségével határoztuk meg. A mikrokapszulák átlagmérete $3,28 \pm 0,6 \mu\text{m}$ volt, úgy, hogy tömeg szerinti 90%-uk a 2-5 μm -es tartományba esett.

Mielőtt bármilyen hatóanyagot hozzákapcsoltunk volna e mikrokapszulákhoz, az 55 percre hőfixáltakat különböző módokon megelemeztek a gyógyszerhordozóként való alkalmasságuk szempontjából.

Szabad tiolcsoport-analízis

Az albumin molekulában jelenlévő szabad tiolcsoport igen érzékeny a molekulán végrehajtott módosításokra és ennél fogva az albumin (natív) állapotának mértékéül szolgálhat. Hasonlóképpen jelen lehet a szabad tiolcsoport a mikrokapszula szerkezetében is, feltéve, hogy az albuminmolekula nem hasadt szét a képződésekor.

A szabad tiolcsoport kimutatását az albumin mikrokapszulákból DTNB, azaz 5,5'-ditio-bisz(2-nitro-benzoésav) segítségével végeztük. Ha szabad tiolcsoport van jelen, az reagál a DTNB-vel, s eredményül olyan nitrobenzoésav-származékot kapunk, amelynek fényelnyelési maximuma 412 nm-nél van. A mikrokapszulák 12 mg/ml töménységű szuszpenziójának fényelnyelését mértük 412 nm-en. A szuszpenzióhoz triszpufferben oldott 20%-os DTNB 50 µl-nyi mennyiségét adtuk hozzá, az elegyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk és mértük a fényelnyelést. Az abszorpciók különbségét meghatározva, a reakciótermék moláris extinkciós együtthatójának felhasználásával kiszámítottuk a mikrokapszulában jelenlévő szabad tiolcsoport koncentrációját. A mikrokapszulákban mérhető molekuláris arány a tiolcsoportok között 0,4785 volt. Ezt az értéket összehasonlítottuk a natív albuminra kapott 0,5045 értékkel. A különbség nem volt szignifikáns és így arra következtettünk, hogy a szabad tiolcsoportok változatlanul megmaradtak a mikrokapszula gyártás folyamán.

A mikrokapszulákat (mind az oldhatókat, mind az oldhatatlanokat) és a natív albumint aminosavakig lebontottuk tömény sósavval, 120 °C-on 24 órán át végzett gőzfázisú hidrolízissel. Ezután 50%-os etanolban oldott trietil-amin, majd trietil-amin és PITC szintén etanolos oldatának hozzáadásával a mintákat derivatizáltuk. A

derivatizált minták elemzését HPLC segítségével, az aminosavak detektálását 254 nm-nél végezve hajtottuk végre.

A leírás végén található 4. táblázat a minták így kapott aminosav-összetételét mutatja be. A különféle minták között - meglepő módon - nincs lényegbevágó különbség; a karboxil-, hidroxil- és amidcsoportokat tartalmazó aminosavakban lépett csak fel csekély veszteség a mikrokapszulák inszolubilizációja következtében.

Peptidanalízis

A mikrokapszulák anyagának és az albuminnak a pepszines emésztését úgy végeztük, hogy a megsavanyított oldatuk 1 ml-éhez 20 µl 1%-os pepszinoldatot adtunk. Az emésztést 37 °C-on 24 órán keresztül végeztük, majd újabb adag pepszint hozzáadva a mintát 37 °C-on újra inkubáltuk mindaddig, amíg az emésztési folyamat teljesen be nem fejeződött. Az így nyert lizátumok HPLC-analízisét acetonitril grádiens alkalmazásával 0,1 % TFA jelenlétében végeztük s a fényelnyelést 214 nm-nél határoztuk meg.

A mikrokapszulák anyagának és az albuminnak a tripszines emésztését olyan mintákon hajtottuk végre, amelyeket előzőleg guanidin-hidrokloriddal, DTT-vel és jódcetamiddal kezeltünk a fehérjestruktúra feltárása céljából. Az ily módon előkezelt mintákhoz 0,2 tripszint adtunk és a mintákat 37 ° C-on addig inkubáltuk amíg az emésztés teljessé nem vált (szükség esetén további tripszint adagoltunk a mintákhoz). A lizátumok HPLC-analízisét a fent részletezett módon végeztük el.

A HPLC kromatogramok elemzése nem mutatott ki szignifikáns különbségeket a mikrokapszulák illetve az albumin szerkezete között. Ez megerősíti azt a felismerést, hogy a mikrokapszulák oldhatatlanná tételét követően is a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezete lényegében véve fennmaradt.

FITC-hoz történő kapcsolás

A FITC (fluoreszcein-izotiocianát) kovalensen kötődik a mikrokapszulák aminocsoportjaihoz és ez a kapcsolódás jól példázza a töltött csoportok bevonásával történő származékképzés elvét, nevezetesen a lizin oldalláncokét olyan gyógyszerhatóanyagokkal, amelyek azután magának a mikrokapszulák mátrixának a lebontásakor szabadulnak fel.

A FITC-t kovalensen hozzákapcsoltuk három mikrokapszula-sarzsából vett mintákhoz. A mikrokapszula/FITC tömegarány 15 : 1 volt. 12,5 mg FITC-t adtunk a szuszpendált mikrokapszulákhoz és az elegyet 30 percen keresztül 30 °C-on inkubáltuk. A fluoreszcein főlegét mosással távolítottuk el a mikrokapszulákból egészen addig, ameddig a mosófolyadékban fluoreszcein már nem volt jelen, azaz a markerként használt anyag kimosódása már nem volt megfigyelhető.

A mikrokapszulákat 0,4 EU/ml koncentrációjú Proteinase K enzimmel emésztettük. Az emésztés során a mikrokapszulákból fluoreszcein szabadult fel és ezt követtük méréseinkkel a mikrokapszula szuszpenzióból időről-időre mintát véve. A felszabadult FITC-t centrifugálással különítettük el a mikrokapszuláktól és a mennyiségét a 493 nm-nél mért fényelnyelésből határoztuk meg.

Az eredmények azt mutatták, hogy minél kevésbé voltak hőfixálva a mikrokapszulák, annál gyorsabb volt a fluoreszcein kezdeti felszabadulása. Ugyanakkor 225 perc eltelte után valamennyi minta esetében a fluoreszcein több mint 90 %-ának szabaddá válása volt megfigyelhető. A különböző hőfixált mikrokapszulákhoz kötődő FITC mennyisége hasonló volt; mindhárom sarzs esetében a hatóanyag/hordozóanyag molarány megközelítőleg $10 \pm 0,5$ % mól/mól volt.

A megkötött hatóanyagok felszabadulásának ütemét ennél fogva be lehet állítani a mikrokapszulák lebomlási sebességének alkalmas "beállítása" révén, még mielőtt a hatóanyagot hozzákapcsolnánk.

Az 1. példa szerint elkészített mikrokapszulákat 30 percig, 37 °C hőmérsékleten teljes emberi vérrel inkubáltuk annak érdekében, hogy megállapítsuk vajon a mikrokapszulák képesek-e serkenteni a vérlemezkék aktiválódását. A mikrorészecskék koncentrációja egy 2000×10^6 részecske/kg dózissal volt egyenértékű. 30 perces inkubációt követően megvizsgáltuk a vérsérumot a kollagén, ADP + arachidonsav rendszerrel stimulált vérlemezke-aggregációra tett hatás szempontjából. Az általános hemosztatikus mechanizmusokra gyakorolt hatást a pro-koaguláns aktivitás mérésével követtük; mértük a részleges tromboplasztin időt, a protrombin időt az 1+2 fragmentumok és a fibrinopeptid-A megjelenéséig; a fibrinolitikus aktivitást pedig az euglobulin lízisidejének mérésével határoztuk meg.

Ennél a koncentrációnál a vizsgálati eljárásban semmiféle nemkívánatos hatás jele nem mutatkozott. Ennélfogva a kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a mikrorészecskék ép, érintetlen állapotúak és hidrofíli tulajdonságúak, ellentétben az emulziós eljárásokkal készült mikrorészecskékkel.

Egy további teszt során az 1. példa módszere szerint előállított mikrorészecskéket gamma-besugárással sterilizáltuk; ehhez sugárforrásként Co^{60} -t használtunk és a minta 25 - 35 Kgray sugárdózist kapott. A mikrokapszulák rekonstitúciójára vizes közegben $1,5 \times 10^9$ mikrorészecske/ml koncentráció mellett került sor, s az így kapott készítményt a Gyógyszeretikai Bizottság engedélyével egészséges férfi önkénteseken $25 - 300 \times 10^6$ mikrorészecske/kg dózisban alkalmazva próbáltuk ki. A mikrorészecskék belül üregesek voltak és levegőt

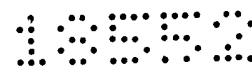
tartalmaztak, ami lehetővé tette, hogy a vándorlásukat, fennmaradásukat a véráramban ultrahangos leképezés segítségével kövessük.

Acuson-128 készüléket alkalmazva a jobb és a bal szívkamráról készített kétdimenziós, szürkeskálás képeket használtuk fel a mikrorészecskék keringésbeli útjának követésére, élettartamuk meghatározására a készítmény iv beadása után. Annak érdekében, hogy mind a bal, mind a jobb szívkamráról készült kép eléggé kontrasztos legyen, jelentős mennyiségű mikrorészecskének kellett a kamrákban jelen lennie. 25×10^6 /kg koncentrációtól fölfelé a kontrasztosság a jobb és a bal kamrában 1 órán át, sőt tovább is fennmaradt, rámutatva arra, hogy jelentős volt a keringésben maradt részecskék mennyisége.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az alaphordozó szerepét betöltő mikrokapszula közömbös a vérben található, véralvadást előidéző molekuláris mechanizmusokkal szemben és így ideálisan alkalmas gyógyszeranyagok szállítására. Ez teljességgel ellentétes az emulziós eljárásokkal készült mikrorészecskéknél tapasztaltakkal, amelyeknek RES-felvételük gyors és féléletidejük a keringésben 10 perc vagy annál kevesebb. Továbbmenőleg a mikrorészecskék nem igénylik a derivatizációt blokkpolimereket képező segédanyagokkal történő összekapcsolás végett, hogy ezáltal növekedjék féléletidejük a keringésben.

2. példa

Ez a példa bemutatja, hogy a mikrokapszulák falképző anyagát tartalmazó, a porlasztva szárításnál felhasznált törzsoldatba különféle adalékanyagokat lehet tenni, s hogy az így kapott mikrokapszulák alacsonyabb hőmérsékleten hőkezelve fixálhatók. Azoknak az adalékanyagoknak, amelyek lehetővé teszik, hogy a mikrokapszulát alkotó polimerben a keresztkötések képződése (inszolubilizáció)



alacsonyabb hőmérsékleten menjen végbe, hasznossága akkor mutatkozik, amikor a gyógyszerhatóanyag oldatát az előbbi törzsoldattal együttporlasztva alakul ki a mátrix, amelybe az utóbbi mindjárt be is épül. Ezeknek az adalékoknak a használatával a hőérzékeny hatóanyagokat tartalmazó mikrokapszulákat előnyösen alacsony hőmérsékleten lehet oldhatatlanná tenni.

A porlasztva szárításhoz használt törzsoldatba 5 mg/ml tirozint adagoltunk, és az 1. példában részleteiben ismertetett módszerrel mikrokapszulákat készítettünk. A porlasztva szárítás kondícióit tekintve nem kellett változtatást végrehajtani ahhoz, hogy mikrokapszulákat nyerjünk.

Az összegyűjtött mikrokapszulákat a korábbiaknak megfelelően hőfixáltuk, de a hőmérséklet csak 100 °C volt 55 percen keresztül, ami szignifikánsan alacsonyabb mint a normálisan alkalmazott 175 °C, 55 percig. Az elért keresztötésesség ugyanolyan fokú volt. A kapott mikrokapszulák átlagos átmérője $3,28 \pm 0,6 \mu\text{m}$ volt, mimellett a részecskék tömeg szerinti 90 %-a a 2 - 5 μm -es tartományba esett.

3. példa

Az 1. példa a 3 μm -es mikrokapszulák előállítását részletesen ismerteti. A jelen példa azt mutatja be, hogy a porlasztva szárítás körülményeinek beállítása révén és egy másodfokon alkalmazott osztályozási lépés segítségével nagyobb méretű mikrokapszulák is gyárthatók, amelyeknek jól kontrollált méretük és méreteloszlásuk van.

20 %-os humán szérumalbumin (HSA) oldatot porlasztva szárítottunk a 2. táblázatban feltüntetett körülmények között. Az összegyűjtött mikrokapszulákat 55 percen keresztül 175 °C hőmérsékleten hőfixáltuk, s az összetapadás, csomósodás megszüntetése után könyökcsöves, gázsugaras osztályozóberendezés felhasználásával (lásd a 3. táblázatot) a részecskéket osztályoztuk.

2. táblázat

Porlasztva szárítási kondíciók	Beállított érték
Belépő hőmérséklet	220 °C
Kilépő hőmérséklet - kezdetben	89,1 °C
Kilépő hőmérséklet - a végén	89,2 °C
Atomizációs nyomás	2,0 bar
Csillapítás beállítás	0,5
Betáplálási sebesség	20,1 g/perc
Betáplált törzsoldat összetétele	20% HSA

3. táblázat

Osztályozási kondíciók	Beállított érték
Primér levegő	0,6 barg
Szekundér levegő	2,0 barg
Venturi levegő	8,0 barg

Az osztályozásnál nyert középső frakciót összegyűjtöttük és újraformáztuk, miután az osztályozási művelet a hordozóanyag nagy részét eltávolítja. A kapott száraz, gördülékeny por jellemzőit az előzőek szerint határoztuk meg. A mikrokapszulák átlagos mérete 12 μm volt, úgy hogy 6 μm alatti gyakorlatilag nem volt, és a mikrorészecskék tömeg szerinti 85 %-ának a méretei 9 - 18 μm közé estek.

A 6 μm alatti részecskék eltávolításával, az artériába történt beadást követően, a mikrokapszulák szisztémikus keringését meggátolja a hajszálerekben való fennakadás. Ennek megvan az az előnye, hogy az odaszállított gyógyszerhatóanyag lokalizált, s így a kívánt helyen a terápiás hatás eléréséhez összességében kevesebb hatóanyagra van szükség. Ez különösen a citotoxikus szerek esetén kívánatos és célszerű, mivel a szisztémikus toxicitásuk a legfőbb oka a gyakran végzetessé váló mellékhatásaiknak.

Ezután antitesteket kötöttünk hozzá a mikrokapszulák falának felszínéhez. A megkötött antitest detektálása céljából FITC-vel jelzett IgG-t használtunk.

5 mg FITC-IgG komplexhez 35 mg perjodátot adtunk. Az elegyet 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 20 mg mikrokapszulát adtunk hozzá. A szuszpenziót 10 percen át kevertük s azután 30 mg nátrium-bór-hidrid hozzáadására bekövetkezett az aktivált antitestek mikrokapszulákhoz való kötődése. A reakciót szobahőfokon 2 óra hosszat engedjük lejárni, majd összegyűjtöttük és átöblítettük a mikrokapszulákat.

Egy mikrokapszula-mintát redukáltunk, felszabadítva a megkötött antitestek könnyű láncait. A mikrokapszulákat eltávolítottuk és a kapott szűrletet felfogtuk. A szűrletben az antitest FITC-vel megjelölt könnyű láncait fluoriméter alkalmazásával mértük.

Az antitesteknek a mikrokapszulákhoz történő kapcsolódását tri- és tetrapeptid spacermolekulákkal is elérhetjük. Ezek a peptidek kovalens kötésekkel kapcsolódnak az antitest felaktivált cukorgyűrűjéhez a fent leírt perjodátos-borohidrides reakció segítségével. Az antitestek ezután az említett peptidspaceren keresztül kapcsolódnak a mikrokapszulákhoz, EDCI reagens alkalmazásával, amint az a 6. példában le van írva.

4. példa

Ez a példa azt mutatja be, hogy adalékanyagoknak a porlasztva szárításra kerülő törzsoldatba, például HSA-oldatba, történő bevitele által az 1. példa eljárása szerint előállított mikrokapszulák kémiai tulajdonságai oly módon változnak meg, hogy a kémiai kötőhelyek száma nagymértékben megnő.

A porlasztva szárításra kerülő törzsoldathoz polilizint adtunk 5 mg/ml koncentrációban. A porlasztva szárítási műveletet az 1. példában részletezett módon hajtottuk végre. Az ebből a módosított törzsoldatból nyert mikrokapszuláknak az átlagátmérője $3,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ volt, és HSA-mikrokapszulákéihoz hasonló tulajdonságokkal rendelkezett, beleértve a reszuszpendálhatóságot is.

Az 1. példa szerinti, polilizinrel adalékolt mikrokapszulákhoz FITC-t kapcsoltunk hozzá. A mikrokapszulákat addig mostuk, amikor már további FITC-kibocsátás már nem volt észlelhető. A FITC a HSA-mikrokapszulákhoz kötve maradt; vizes szuszpenzióban e kötés disszociációja nem mutatkozott. A mikrokapszulákat az 1.példában részletesen ismertetett módon elemésztettük és a mikrokapszulákhoz kötődő fluoreszcein teljes mennyiségét mértük.

A fluoreszcein szabaddá válása sebességének tanulmányozása az emésztés során azt mutatta, hogy a fluoreszcein felszabadulása gyorsabb ütemű volt mint a standard mikrokapszulákból. Mindazonáltal a mérések szerint összességében 20 mól% fluoreszcein a mikrokapszulákhoz kötve maradt, s ez 50 %-os növekedést jelent a standard mikrokapszulák összetételéhez képest.

5. példa

A példa azt demonstrálja, hogy a hatóanyagok a kapszulahéjhoz köthetők, és a szabaddá válásuk ütemét magának a kapszulának a lebomlása szabályozza.



10 mg/ml koncentrációjú metotrexát-oldathoz 25 mg karbodiimidet (EDCI) adtunk. Az oldatot 4 órán keresztül kevertettük a metotrexát aktiválásának beindítására majd a folyamat teljessé tételének céljából. 50 mg az 1. példa szerint készített HSA mikrokapszulát hozzáadtunk az aktivált gyógyszerhatóanyaghoz, s az elegyet 3 órán át szobahőfokon kevertettük. A metotrexát kémiaiilag kötődött a mikrokapszulák anyagához az albumin aminocsoportjain keresztül. A mikrokapszulákat összegyűjtöttük és kimostuk, hogy a lazán kötődő metotrexátot eltávolítsuk.

A metotrexáttal kapcsolódott mikrokapszulák fizikai jellemzőit és gyógyszer tartalmát egyaránt meghatároztuk. A mikrokapszulák átlagmérete $3,2 \pm 0,6$ μm volt, úgy hogy a tömeg szerinti 90 %-ának mérete a 2 - 5 μm tartományba esett. A gyógyszer tartalom analízise azt mutatta, hogy a mikrokapszulák a vizes közegben való reszuszpendáláskor nem engedték el a gyógyszerhatóanyagot. Sőt egy 3 hónapos stabilitásvizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy ennyi idő után sem volt gyógyszer felszabadulás. Az albumin mikrokapszulák Proteinase K-val történő emésztése felszabadította a kötött gyógyszert, amelyről kiderült, hogy csak kevés számú aminosavhoz és kisebb peptidekhez kapcsolódott a molekulán belül.

6. példa

Az 1. példában ismertetett általános módszer felhasználásával gyártott mikrokapszulákat karbodiimid segítségével doxorubicinnel konjugáltunk. 3 mg doxorubicint, 6 mg EDCI-t és 100 mg mikrokapszulát 6,6 pH-jú desztillált vízben felfuszpendáltunk és 37 °C hőmérsékleten, folyamatos keverés mellett 20 órán keresztül reagáltattunk, folyamatos reszuszpenzió biztosítása mellett s azután a kapott terméket formuláltuk.

A doxorubicin-mikrokapszula komplexet elemeztük a gyógyszer tartalomra nézve és meghatároztuk a jellemzőit. Az eredmények azt mutatták, hogy a

mikrokapszulák jellemzőiben semmiféle változás nem állt be a gyógyszerkonjugáció folyamán. A gyógyszer tartalmát enzimatikusan emésztett mikrokapszula-mintán HPLC-analízissel határoztuk meg. 2 % gyógyszer tartalmat mértünk, és kimutattuk, hogy a gyógyszer csak kevésszámú aminosavhoz vagy kismólsúlyú peptidekhez kapcsolódik.

Korábban kimutatták, hogy a polimer hordozókhoz kötött doxorubicin kedvező hatású azokkal a tumorfajtákkal szemben, amelyekre a többféle gyógyszerrel szemben is rezisztens fenotípus a jellemző.

7. példa

Az 1. példában ismertetett módszer felhasználásával gyártott mikrokapszulákat 2'-dezoxi-5-fluor-uridin (FUDR) oldalláncok hozzákapcsolásával derivatizáltuk. A gyógyszerhatóanyag molekuláit borostyánkősavanhidridel aktiváltuk.

0,2 M 8,3 pH-jú foszfátpufferhez 40 mg FUDR-t adagoltunk. Ehhez az oldathoz 200 mg borostyánkősavanhidridet adtunk hozzá, majd a reakcióelegyet 30 °C-on 2 órán át kevertettük, miközben a pH-t 8,3 értéken tartottuk 1 M NaOH hozzáadagolása útján. Ezután a pH-t 6,5-re állítottuk be és 0,5 g mikrokapszulát adtunk az elegyhez. 10 percig tartó keverés után 15 :1 arányban EDCI-t és N-hidroxi-szukcinimidet adtunk a szuszpenzióhoz s a kapcsolási reakciót szobahőmérsékleten hagytuk végbemenni. 24 óra elteltével a mikrokapszulákat összegyűjtöttük, átmostuk és a FUDR jelenlétét a mikrokapszulákban HPLC-analízis segítségével igazoltuk. A gyógyszermolekulával összekapcsolt mikrokapszulák savas hidrolízisét ASTED rendszerben végeztük, 1 % TFA-t használva, és a FUDR felszabadulását 269 nm hullámhossznál mértük. Úgy találtuk, hogy 15 tömeg% FUDR kötődött a mikrokapszulákhoz a savasan hidrolizálható kötésekön keresztül.

Citotoxikus aktivitás

Az 5. - 7. példák szerinti gyógyszerhatóanyag-mikrokapszula konjugátumok citotoxikus aktivitását *in vitro* mértük. A HSN sejtvonalat használtuk. Ez egy kémiai úton kiváltott patkány vastagbél szarkóma, amely állatmodellekben olyan májtumorokat okoz, amelyeknek a véredény mintázata hasonlít az emberi vastagbél-végbél májáttételekben látható mintázathoz. A sejtpusztulást közvetve, MTT használatával mértük. Ez az anyag aktív mitokondriumok jelenlétében formazánná, egy színes metabolittá redukálódik. A HSN sejteket többlyukú lemezek alkalmazásával inkubáltuk, és ezekbe a mintatartókba adagoltuk be a gyógyszer-mikrokapszula lizátumot illetve a gyógyszer kontroll dózisát. Különböző reakcióidőtartamok eltelte után MTT-t adtunk a mintákhoz és a formazán koncentrációját mértük, mint a sejtpusztulás jelét. A tesztet úgy végeztük, hogy előzőleg ezt a sejtvonalat más, ismert számú sejtet tartalmazó standardokkal szemben kalibráltuk.

Mind a három gyógyszernek (metotrexát, 5-FUdR és doxorubicin) hasonló dózisválaszgörbéi voltak a natív gyógyszer illetve a gyógyszer-mikrokapszula lizátum esetében, ami arra utal, hogy a citotoxikus aktivitás hasonló volt. A sejtaktivitás maximális csökkenésének mértéke mindhárom gyógyszer és a lizátumok esetében megközelítőleg 80%-os volt. Az 5-FUdR és a metotrexát esetében a dózisválaszgörbe legmeredekebb szakasza az 1 $\mu\text{g/ml}$ -től lefelé az 0,01 $\mu\text{g/ml}$ -ig terjedt, a doxorubicinnál pedig 0,1 $\mu\text{g/ml}$ -től, de az *in vivo*, a szérumban előforduló értékek tartományán belül maradt. A nem derivatizált mikrokapszulákból származó kontroll lizátumok nem mutattak citotoxikus aktivitást.

8. példa

Ez a példa azt illusztrálja, amikor a hatékony molekulát nem közvetlenül, hanem egy lebontható, "spacer" (távartó) vagy "linker" (összekötő) molekulán keresztül kapcsoljuk a mikrokapszula falához. Ez nagyobb ellenőrzési lehetőséget biztosít, mind a hozzákapcsolást, mind a hatóanyag felszabadulásának a folyamatát tekintve.

A WO-A-9317713 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban részletesen ismertetett gyógyszereknek vízoldható hordozókkal történő összekapcsolását leíró technológia alkalmazásával, tejsav spacer felhasználásával, naproxent kötöttünk hozzá a mikrokapszulákhoz. L-tejsav 10 mmól dimetil-formamidos szuszpenziójához 20 mmól trietil-amint és 10 mmól pentametil-benzil-kloridot (PMB-klorid) adtunk hozzá. Az elegyet addig hevítettük, amíg oldat nem képződött, s ezt azután szobahőmérsékleten tartottuk. Miután az oldatot egy éjszakán át inkubáltuk, fölös mennyiségű nátrium-karbonátot adtunk hozzá és a kicsapódott észtert, az L-tejsav-PMB-t, összegyűjtöttük, átöblítettük és megszáritottuk.

Egy 10 mmól naproxent, L-tejsav-PMB-t és 4-dimetil-amino-piridint tartalmazó oldathoz 11 mmól diciklohexil-karbodiimid oldatát adtuk hozzá. A reakcióelegyet 25 °C hőmérsékleten kevertettük és a naproxen-linker képződését követtük. Amikor a reakció befejeződött, a naproxen-L-tejsav linkert összegyűjtöttük, átöblítettük és megszáritottuk.

A PMB védőcsoportot a naproxen linker anizollal és trifluor-ecetsavval szobahőmérsékleten 2 perc alatt lejátszódó reakciójának segítségével távolítottuk el. A reagens feleslegét vákuumban eltávolítottuk és a maradékot összegyűjtöttük és mostuk. A mosott maradék megsavanyítása naproxen-L-tejsavat eredményezett,

amelyet extraháltunk, mosással megtisztítottunk és vákuumban 50 °C-on kiszárítottunk.

A naproxen-L-tejsavat karbodiimiddel 1:1 arányban reagáltatva aktiváltuk, amit 1 mmól N-hidroxi-szukcinimid hozzáadása követett. Az aktív naproxen-L-tejsav-NHS-t HSA mikrokapszulákhoz adtuk hozzá 5:1 arányban, borátpufferben. A kapott terméket összegyűjtöttük és megszáritottuk.

A megszáritott naproxen mikrokapszulák formulálása után gördülékeny porterméket kaptunk, amelyben a mikrokapszulák átlagos mérete $3,5 \pm 0,6 \mu\text{m}$ volt. A mikrokapszulák tömeg szerinti 90%-ának a mérete $2 \mu\text{m}$ és $5 \mu\text{m}$ közé esett.

A termék analízisét Beckman-gyártmányú kapilláris, zónás elektroforézis készülékkel végeztük el. Az elemzés kimutatta a gyógyszer jelenlétét a mikrokapszulákon. A gyógyszer szabaddá tételét észteráz enzimek használatával végeztük és a felszabadult naproxen ezt követő analízisét ASTED rendszer alkalmazásával hajtottuk végre, ahol a rendszer egy Gilson HPLC-készülékhez (gyártó: Anachem, Egyesült Királyság) volt kapcsolva. A gyógyszermolekula a vizsgálatok szerint natív állapotban, épen megmaradt.

9. példa

A mikrokapszulák porlasztva szárítással történő előállítása lehetővé teszi, hogy a gyártási eljárást több szempontból is kézbentarthassuk és a végtermék mikrokapszulák jellemzőit kontrollálhassuk. A végtermék felszínének jellemzőit úgy változtathatjuk meg, hogy különböző enzimek ligandumait vagy receptorait beleépíthetjük a mikrokapszulák falába. Ebben a példában az arginin aminosavmaradékok számát növeltük meg, és ez fokozta a TPA-kötő képességet.

Az 1. és 5. példákban leírt eljárást felhasználva a porlasztva szárítási törzsoldathoz poliarginint adtunk. Az 1. példában leírt feltételekkel megegyezően

állítottuk elő a mikrokapszulákat. A mikrokapszulák átlagmérete $3,31 \pm 0,6 \mu\text{m}$ volt, és a mikrokapszulák tömeg szerinti 90%-ának a mérete $2 \mu\text{m}$ és $5 \mu\text{m}$ közé esett.

100 mg mikrokapszulához $250 \mu\text{g}$ TPA oldatát adtuk. A kapott szuszpenziót 2 órán keresztül ráztuk, majd a mikrokapszulákat eltávolítottuk és átöblítettük. A reakcióoldatban maradó TPA koncentrációját fordított fázisú HPLC segítségével mértük azt követően, hogy a peptidet 20 mmól DTT-ben, 37°C -on, 8 mól karbamid jelenlétében 30 percig inkubálva redukáltuk. A fragmentumok analízisét 0,1% TFA-t is tartalmazó 10 - 40% acetonitril-víz grádiens felhasználásával, 60 percen keresztül végeztük.

A TPA-mikrokapszulákat a vérrög-lizátum vizsgálat alkalmazásával a TPA jelenlétére nézve analizáltuk. A fibrinrögöt fibrinogén, trombin és a TPA-mikrokapszulák kombinálásával állítottuk elő. Ekkor plazminogént adtunk a fibrinrögökhöz és egy üveggyöngyöt is tettünk a felszínére, amely lehetővé tette, hogy a vizsgálat végpontját, azaz a rög feloldódását, meghatározzuk. Az üveggyöngy keresztülesése a lizálódott rögön azt mutatja, hogy a TPA kötődik a mikrokapszulákhoz és hogy megőrizte az aktivitását.

Ezen túlmenően a mikrokapszulákhoz kötött TPA mennyiségét egy módosított fibrinteszt alkalmazásával is meghatároztuk. Egy mikrotiter lemezre egy fibrinogént és trombint tartalmazó vékony agarózgélt vittünk fel. A gélhez $20 \mu\text{l}$ TPA-mikrokapszula szuszpenziót és plazminogént adtunk hozzá. 30 perc eltelte után a lemezt lemostuk és a gél turbiditásának csökkenését 340 nm-en mikrotiter lemez leolvasó segítségével meghatároztuk. A mikrokapszulán jelenlevő TPA-koncentrációt megfelelő TPA-standardok segítségével határoztuk meg. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a TPA 15 - 20 %-a kötődött a mikrokapszulákhoz.

A TPA-mikrokapszuláknak az előnye abban nyilvánulhat meg, hogy trombolitikus ágens depóként funkcionálhatnak angiográfiás vizsgálatoknál történő alkalmazáskor, hasonlóan ahhoz, amint a WO-A-9408627 közzétételi számú PCT szabadalmi leírásban az echokontraszt ágens depójaként való alkalmazást leírják. Ennek előnye abban jelentkezik, hogy egy, a szívizomban elhelyezkedő lokalizált TPA-rezervoár jön így létre, amely fenn is marad.

4. táblázat

A natív albumin és a mikrokapszulák aminosav-összetétele

Aminosav	HSA (n = 5)	oldható mikrokapszulák (n = 5)	oldhatatlan mikrokapszulák (n = 7)
Aszparaginsav	50,188 ± 2,73	57,99 ± 4,13	59,23 ± 4,81
Glutaminsav	79,31 ± 5,44	80,47 ± 2,26	85,70 ± 4,04
Szerin	23,21 ± 1,39	23,2 ± 1,23	20,65 ± 2,44
Glicin	14,54 ± 0,71	15,33 ± 0,38	14,93 ± 1,07
Hisztidin	17,34 ± 1,06	17,65 ± 1,01	16,42 ± 0,85
Treonin	26,99 ± 1,34	27,23 ± 1,56	28,39 ± 2,38
Alanin	63,83 ± 1,34	61,45 ± 0,96	62,69 ± 1,86
Arginin	25,18 ± 0,95	24,39 ± 1,02	23,15 ± 1,55
Prolin	28,36 ± 1,17	27,45 ± 2,03	25,20 ± 3,05
Tirozin	18,37 ± 0,71	18,02 ± 0,42	16,13 ± 1,38
Valin	35,54 ± 1,49	35,07 ± 1,03	37,59 ± 4,53
Metionin	7,99 ± 0,5	7,68 ± 0,42	6,24 ± 1,16
Izoleucin	6,42 ± 0,54	6,64 ± 0,57	8,96 ± 1,78
Leucin	63,22 ± 3,48	62,13 ± 3,14	59,28 ± 4,38
Fenilalanin	32,00 ± 2,73	30,45 ± 2,13	30,48 ± 1,92
Lizin	56,185 ± 2,50	53,45 ± 1,62	51,68 ± 3,67

Szabadalmi igénypontok

1. Sima felszínű, 0,1 - 50 μm átmérőjű gömbalakú mikrorészecskékből álló steril por, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mikrorészecskék hidrofílek és monodiszperz szuszpenzióvá képesek rekonstituálódni vízben, s e mikrorészecskék még valamilyen élettanilag vagy diagnosztikailag aktív komponenst is tartalmaznak, amely közvetlenül vagy közvetve kapcsolódik a mikrorészecskékhez a rajtuk levő szabad funkciós csoportok révén.
2. Az 1. igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mikrorészecskék anyaga valamilyen aminosav, poliaminosav vagy más polipeptid.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az még további vízoldható anyago(ka)t is tartalmaz, amely(ek) megkönnyíti(k) az enzimátikus lebontást.
4. Bármelyik előző igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az aktív komponens valamilyen gyógyszerhatóanyag, kémiai spacer, valamilyen enzimhez vagy receptorhoz kötődő ligandum vagy antitest.
5. Bármelyik előző igénypont szerinti, vízben oldódó és az említett funkciós csoportokkal rendelkező por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy

(i) az említett anyagokból porlasztva szárítással és keresztkötések képzése révén úgy nyerjük, hogy az említett csoportok szabad állapotban maradnak, és

(ii) az aktív komponenst az említett csoportokon keresztül hozzákapcsoljuk a mikrokapszulák keresztkötéseket tartalmazó anyagához.

6. Az 5. igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az előző igénypont szerinti (i) lépés magába foglalja a vízdoldható anyag oldatának porlasztva szárítását, keresztkötések kialakítását a megszárított anyagban hőkezelés útján, kevesebb mint 4 % nedvesség jelenlétében.

7. Bármelyik előző igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a bennelevő funkciós csoportok amino-, hidroxil-, karboxil- vagy szulfhidrilcsoportok.

8. A 7. igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a funkciós csoportok amino-, hidroxil- vagy karboxilcsoportok.

9. Bármelyik előző igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mikrorészecskék interkvartilis mérettartományának az átlagos átmérőjükhöz viszonyított aránya 0,2 és 0,5 között van.

10. A 9. igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a részecskék 95 %-a kisebb 6 μm -nál és a részecskék 80 %-ának mérete az 1 - 6 μm -es tartományba esik.

11. A 9. igénypont szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a részecskék 90 %-a kisebb mint 20 μm és a részecskék térfogat szerinti kevesebb mint 5%-a kisebb 6 μm -nál.

12. Bármelyik előző igénypont szerinti mikrorészecske szuszpenzió a z z a l j e l l e m e z v e, hogy parenterális alkalmazásra megfelelő.

13. A 12. igénypont szerinti mikrorészecske szuszpenzió a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a 10. igénypont szerinti mikrorészecskéket tartalmazza és intravénás alkalmazásra megfelelő.

14. A 12. igénypont szerinti mikrorészecske szuszpenzió a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a 10. igénypont szerinti mikrorészecskéket tartalmazza és intraartériás alkalmazásra megfelelő.

15. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti por a z z a l j e l l e m e z v e, hogy aktív összetevője citotoxikus hatóanyag.

16. A 15. igénypont szerinti port tartalmazó gyógyszerkészítmény gyártására szolgáló doxorubicin a z z a l j e l l e m e z v e, hogy többféle gyógyszerrel szemben is rezisztens fenotípusba tartozó daganatos megbetegedések kezelésére használjuk.

A meghatalmazott:

ADVOPATENT SZABADALMI IROD.
FABER MIKLÓS
szabadalmi ügyvivő
1041 Budapest, Fő u. 19.

Aha-véltel
1999.01.18.