(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 963065 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963065

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 9/127
A61K 9/50
A61K 31/70

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.02.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.08.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **30.09.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **06.02.1995 PCT/SE1995/000116**

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

04.02.1994 SE 9400368 12.07.1994 SE 9402455

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Lipocore Holding AB,** Box 6686, 113 84 Stockholm, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Carlsson, Anders,** Stockholm, SVERIGE, (SE)
2 • **Herslöf, Bengt,** Stockholm, SVERIGE, (SE)
3 • **Petrovic-Källholm, Snezana,** Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Kaksikerroksiset valmisteet
Preparat med dubbla lager

Kaksikerroksiset valmisteet
Preparat med dubbla lager

Tämän keksinnön kohteena ovat kaksikerroksiset lipidivalmisteet polaarisissa liuottimissa. Näitä valmisteita voidaan käyttää aktiivisen aineen kantajina farmaseuttisessa koostumuksessa, mutta myöskin ravitsemukseen liittyvissä tuotteissa, kosmeettisissa tuotteissa, elintarviketuotteissa ja maataloustuotteissa.

Luonnollisia amfifiilisia lipiditäyteaineita on käytetty vain hyvin rajallisesti farmaseuttisessa ja kosmeettisessa valmistuksessa. Syynä on usein raaka-aineen puuttuminen ja suuret tuotantokustannukset sekä lopullisen lipidimateriaalin huono suorituskyky.

Luonnollisista polaarisista, kaksikerroksia muodostavista lipideistä, eli amfifiilisista lipideistä fosfolipidit ovat kaikkein yleisimpiä farmaseuttisessa ja kosmeettisessa käytössä. Niiden kaksikerroksia muodostavan kyvyn ansiosta näitä polaarisia lipidejä voidaan käyttää erilaisten ryhmittymien (aggregate) ja hiukkasten kuten vesikkeleiden eli rakkuloiden ja nestekiteiden muodostamiseksi, joille ryhmittymille ja hiukkasille on löytynyt monia teknisiä sovellutuksia.

Fosfolipideihin perustuvia lipidigeelejä on kuitenkin käytetty vain hyvin rajallisesti farmaseuttisessa teknologiassa johtuen pääasiassa riittämättömistä geelinmuodostuskyvyistä sekä huonosta kemiallisesta stabiilisuudesta. Tähän saakka pääasiallisesti käytetty hallitseva luonnollinen polaarinen, kaksikerroksia muodostava lipidi eli munankeltuaisesta tai soijapavusta saatu fosfatidyylikoliini on hieman liian lipofiilinen, jotta se voisi turvota optimaalisella tavalla vedessä ja muodostaa monikäyttöisiä kaksikerroksia, jotka muodostavat nestekidemäisen lamellirakenteen.

Koska liposomit ovat kaksikerroksisten tai lamellifaasien dispersioita ylimäärässä vesiliuosta, niin liposomeja muodostettaessa ei ole optimaalista käyttää fosfolipidiin perustuvia lamellifaaseja. Turpoamistapahtuma on hidas ja mekaanista energiaa on käytettävä usein hyvin suuria määriä liposomien ja vesikkeleiden muodostamiseksi fosfolipidimateriaalista kohtuullisen ajanjakson aikana.

Luonnolliset fosfolipidit kuten munankeltuaisesta saatu fosfatidyylikoliini ovat erittäin tyydyttymättömiä. Fosfolipidin asyyliketjujen tyydyttymättömyys on edellytys nestekidemäisen lamellifaasin muodostumiselle huoneen lämpötilassa. Tämä tarkoittaa kuitenkin myös sitä, että luonnollisten fosfolipidien muodostamat kaksikerroksiset kalvot läpäisevät hyvin vesiliukoisia lääkeaineita, koska asyyliketjut ovat järjestäytymättömässä juoksevassa tilassa. Niinpä luonnollisista fosfolipideistä muodostettujen liposomien tunnusomaisena piirteenä on pieni kapseloiva teho siksi, että sisällytetty lääkeaine kulkeutuu liposomaalisten kaksikerrosten läpi. Tavallisesti, mikäli lääkeaineet on tarkoitus sisällyttää luonnollisiin fosfolipidiliposomeihin, niin ne on stabiloitava lisäämällä suuria määriä kolesterolia, 30-50 mooli-% lipidikoostumuksen kokonaispainosta.

Tämä pätee myös lääkeaineiden lisäksi muihin aktiivisiin aineisiin, joita halutaan jostain syystä sisällyttää liposomeihin tai muihin kaksikerroksisiin rakenteisiin.

Fosfolipideihin perustuvilla vesikkeleillä ja liposomeilla on tavallisesti hyvin lyhyt elinikä sen jälkeen, kun niitä on sisällytetty verenkiertoon. Niiden nopea häviäminen verestä johtuu niiden siirtymisestä maksan ja pernan retikulo-endoteelijärjestelmään (RES). Tämän välttämiseksi liposomit voidaan stabiloida steerisesti lisäämällä lukuisia hiilihydraattiyksiköitä sisältäviä gangliosideja tai hydrofiilisia polymeereja kuten polyeteenioksidia tai pullulaania. Nämä viimeksimainitut aineet sitoutuvat tavallisesti kovalenttisesti fosfatidyylie-

tanoliamiiniin. Tämä lähestymistapa on periaatteessa hyvin tehokas ja nämä muokatut liposomit voivat välttää siirtymisen RES-järjestelmään. Käytännössä on kuitenkin epäedullista lisätä liposomivalmisteeseen ylimääräisiä komponentteja, olivatpa ne luonnollisia ja harvinaisia ja näin ollen kalliita, tai synteettisiä ja näin ollen ei välttämättä biologisesti yhteensopivia, sekä turvallisuuteen että taloudellisuuteen liittyvistä syistä.

Alalla tunnetaan hyvin fosfolipidien ja muiden polaaristen lipidien käyttö nestekiteiden ja liposomien valmistamiseksi.

Patenttijulkaisussa EP-B1-0 126 751 on kuvattu hallitusti vapauttava koostumus, joka voi sisältää amfifiilista ainetta kuten galaktolipidejä, fosfolipidejä ja monoglyseridejä. Tämän patenttijulkaisun kohteena ovat kuutiomaiset ja käänteisheksagonaaliset nestekidefaasit, jotka ovat pysyviä ylimäärässä vesiliuosta.

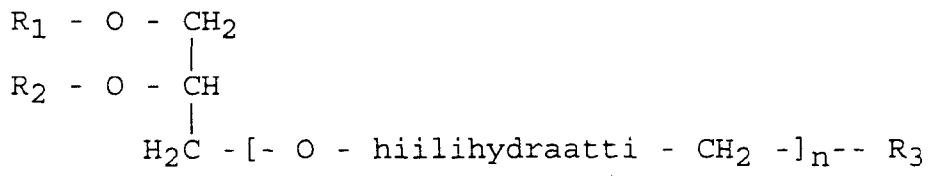
Patenttijulkaisussa WO 91/11993 on kuvattu alkoholinen vesigeelityyppinen fosfolipidikoostumus. Alkoholi on etanoli, 1-propanoli tai 2-propanoli. Fosfolipidipitoisuus on alueella 15-30 % (p/p). Julkaisussa kuvataan samoin tämän fosfolipidikoostumuksen käyttö liposomien valmistamiseksi laimentamalla vesiliuoksella, sekä tätä geeliä sisältäviä paikallisesti käytettäviä valmisteita.

Patenttijulkaisussa 91/04013 on kuvattu hybridiset niukkalamellaariset lipidivesikkelit, jotka sisältävät fosfo- tai glykolipidiä sekä ei-ionista, anionista tai kahtaisionista pinta-aktiivista ainetta lipidikaksoiskerroksissa. Edullisia glykolipidejä ovat serebrosidit, gangliosidit ja sulfatidit, jotka kaikki kuuluvat glykosfingolipidiperheeseen.

Glykosyyliglyseridit ovat glykolipidien eräs tyyppi ja ne ovat kasvisolumembraanien hyvin tunnettuja komponentteja. Kaksi galaktoosiin perustuvaa tyyppiä ovat hyvin tavallisia eli

monogalaktosyylidiasyyliglyseroli, MGDG, ja digalaktosyylidiasyyliglyseroli, DGDG, joiden osuus on jopa 40 % tylakoidikalvojen kuivapainosta.

Kasvien glykolipideissä on hiilihydraattiyksiköitä, jotka ovat pääasiassa galaktoosia, ja jotka ovat kytkeytyneet glyseroliin. MGDG:ssä galaktoosirenkaan 1-asemassa on ß-liitos glyseroliin, ja DGDG:ssä sokereiden välissä on α,1->6-sidos. Vähäisempi aineosa on kasvin sulfolipidi, jonka oikeampi nimi on sulfokinovosyylidiasyyliglyseroli, SQDG, joka sisältää sulfonaattiryhmän, eikä hydroksyyliryhmää, kytkeytyneenä päättävän deoksiglukoosijäännöksen 6-hiileen. Useimmat kasvien glykolipidit voidaan esittää seuraavalla yleisellä kaavalla:



missä R_1 ja R_2 ovat toisistaan riippumatta tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä rasvahappojäännöksiä, joissa on 2-24 hiiliatomia ja 0-6 kaksoissidosta, edelleen esteröityneitä hydroksihappoja eli estolideja tai vety; hiilihydraatti on monosakkaridiyksikkö; n = 1-5; ja R_3 on hydroksyyli- tai sulfonaattiryhmä.

Glykosyyliglyseridien ja veden ja muiden polaaristen liuottimien välistä vuorovaikutusta tutkittaessa on todettu yllättäen, että viljasta peräisin olevat erityiset glykolipidimateriaalit käyttäytyvät siten, että mainitut lipidimateriaalit ovat sopivia ja yksinkertaisia ajatellen käyttämistä kantajamateriaalina erityisesti farmaseuttisissa koostumuksissa sekä myös muissa valmisteissa kuten kosmeettisissa, maatalouteen ja ravitsemukseen liittyvissä sekä elintarvikesovellutuksissa.

Hyvin tunnettua on se, että viljakasveista peräisin olevat lipidit voivat vuorovaikuttaa veden kanssa johtuen siitä, että ne käsittävät suhteellisen suurren osuuden polaarisia kompo-

nentteja, jolloin muodostuu lamellaarinen nestekidefaasi (G. Jayasinghe et al., J. Disp. Sci. Technol., 1991, vol. 12, sivut 443-451).

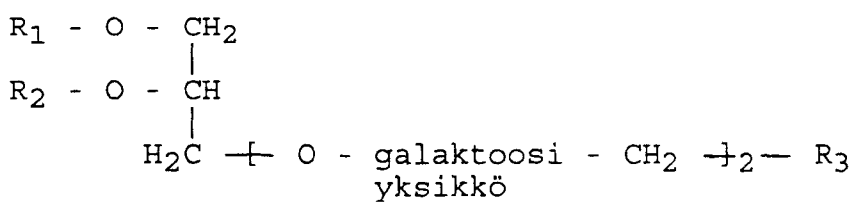
Patenttijulkaisussa SE 9400368-8 on kuvattu teollisesti käyttökelpoinen menetelmä glykolipidimateriaalin valmistamiseksi kasveista, edullisesti viljakasveista uuttamalla ja kromatografisesti erottamalla. Täten valmistettuja glykolipidimateriaaleja voidaan käyttää amfifiilisena materiaalina farmaseuttisissa ja kosmeettisissa tuotteissa sekä elintarvikkeissa.

Tämän keksinnön kohteena on lipidipolaarisesta liuottimesta muodostettu kaksikerroksinen valmiste, joka koostuu 0,01-90 paino-%:sta, edullisesti 0,1-50 %:sta kaksikerroksen muodostavaa materiaalia polaarisessa liuottimessa, tämän valmisteen ollessa tunnettu siitä, että kaksikerroksen muodostava materiaali on viljakasveista saatua galaktolipidimateriaalia, joka koostuu vähintään 50 %:sesti digalaktosyylidiasyyliglyseroleista, lopun ollessa muita polaarisia lipidejä.

Edullisessa valmisteessa galaktolipidimateriaali koostuu noin 70-80 %:sta digalaktosyylidiasyyliglyseroleja ja 20-30 %:sta muita polaarisia lipidejä.

Eräässä toisessa edullisessa valmisteessa tämä galaktolipidimateriaali koostuu jopa 100 %:sta digalaktosyylidiasyyliglyseroleja.

Digalaktosyylidiasyyliglyserolit voidaan kuvata seuraavalla yleisellä kaavalla:



missä R_1 ja R_2 ovat toisistaan riippumatta tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä rasvahappojäännöksiä, joissa on 10-22 hiili-

atomia ja 0-4 kaksoissidosta tai vety; ja R_3 on hydroksyyli- tai sulfonaattiryhmä.

Edullisina esimerkkeinä rasvahappojäännöksistä R_1 ja R_2 voidaan mainita luonnossa esiintyvät rasva-asyyliryhmät kuten jäännökset, jotka ovat peräisin tyydyttyneistä hapoista palmitiinihappo ($C_{15}H_{31}CO$; 16:0) ja stearііnihappo ($C_{17}H_{35}CO$; 18:0); monotyydyttymättömästä haposta öljyhappo ($C_{17}H_{33}CO$; 18:1); sekä polytyydyttymättömistä hapoista linoleiinihappo ($C_{17}H_{31}CO$; 18:2) ja linoleenihappo ($C_{17}H_{29}CO$; 18:3). Nämä rasvahappojäännökset voivat myös sisältää glyseroliyksikköön kytkeytyneitä hydroksihappoja, joiden hydroksyyliryhmät ovat esteröityneet muilla rasvahapoilla, eli niinkutsuttuja estolideja.

Muut polaariset lipidit, jotka ovat osa galaktolipidimateriaalia, ovat erilaisten glyko- ja fosfolipidien kuten MGDG:n ja fosfatidyylikoliinien seos. Koostumus riippuu lähtömateriaalista sekä galaktolipidien valmistamiseksi käytetystä menetelmästä.

Galaktolipidimateriaalin komponenttien erityiset osuudet eivät ole kriittiset esillä olevassa keksinnössä, kunhan vain DGDG:n pitoisuus on vähintään 50 %. Kuitenkin monissa sovellutuksissa parhaimmat edut saavutetaan suurella DGDG-pitoisuudella, joka DGDG on tärkein kaksikerroksen muodostava komponentti.

Galaktolipidimateriaalia voidaan uuttaa lähes millaisesta kasvimateriaalista tahansa. Edullisia kasvimateriaaleja ovat erilaisten siemen- ja viljakasvien kuten vehnän, rukiin, kauran, maissin, riisin, hirssin ja seesamin siemenet ja jyvät. Kauraryynit sekä vehnän gluteeni sisältävät lipidiä suurena pitoisuutena, ja tästä syystä niitä käytetään edullisesti tässä valmistusprosessissa. Galaktolipidimateriaalin digalaktosyylidiasyyliglyserolit voivat myös olla synteettistä alkuperää sovellutuksesta riippuen.

Galaktolipidimateriaalia voidaan käyttää polaarisena lipidikomponenttina erilaisissa järjestäytyneissä liuoksissa, joissa lipidi muodostaa järjestäytyneitä hiukkasia, jotka ovat dispergoituneet laimeaan, satunnaisesti sekoitettuun liuokseen, esimerkkeinä vesi, etanoli, glyseroli ja muut polaariset liuottimet tai niiden seokset. DGDG:n molekyyligeometria muistuttaa katkaistua kartiota, minkä seurauksena voidaan muodostaa taipuisia kaksikerroksia eli lamellaarisia nestekidefaaseja sekä liposomeja tai vesikkeleitä vesiliuokseen fysiologisissa olosuhteissa.

Galaktolipidit voivat ottaa vastaan suuria määriä polaarista liuotinta kuten vettä, eli turvota. Veden lisääminen galaktolipideihin johtaa kirkkaan, viskoosin geelin spontaaniin muodostumiseen. Tämä geeli koostuu lamellaarisesta nestekidefaasista, L_α, jossa lipidikaksikerrokset vuorottelevat veden kanssa lamellaarirakenteessa. Tämä L_α-faasi, joka voidaan todeta helposti polarisoivalla valomikroskoopilla, on termodynaamisesti pysyvä.

Turpoamistapahtuma on suhteellisen hidas johtuen geelin lamellaarisen nestekiderakenteen suuresta viskositeetista; kuitenkin on mahdollista valmistaa kirkkaita homogeenisia näytteitä, jotka sisältävät niinkin vähän kuin 10 % (p/p) vesiliuosta 24 tuntia hitaasti sekoittaen. Geelin muodostumisen jälkeen se on äärimmäisen stabiilia kemiallista ja mikrobiologista hajoamista vastaan, ja näin ollen sen fysikaalinen eheys säilyy pitkän ajanjakson ajan.

Galaktosyyliasyyliglyserolien ja polaarisen liuottimen vuorottelevat kerrokset tekevät geelirakenteen sopivaksi sekä lipofiilisten että hydrofiilisten bioaktiivisten aineiden sisällyttämiseksi. Tällä lamellirakenteella on suhteellisen pieni viskositeetti suurilla leikkaussuhteilla, minkä ansiosta geeliä voidaan injektoida ruiskun ja ohuen neulan avulla. Tätä valmistetta voidaan käyttää lääkeaineiden antamiseksi eri kohtiin ihmisissä ja eläimissä.

Polaariset liuottimet ovat edullisesti sellaisia, jotka ovat biologisesti yhteensopivia, ja jotka ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi farmaseuttisissa, kosmeettisissa tai elintarvikevalmisteissa, ja esimerkkeinä voidaan mainita vesi, etanoli, 1-propanoli, 1,2-propaanidioli, glyseroli ja niiden seokset.

Erään edullisen suoritusmuodon mukaisesti keksintö kohdistuu geelivalmisteeseen, joka käsittää 25-90 paino-% galaktolipidimateriaalia polaarisessa liuottimessa.

Geelejä voidaan valmistaa helposti lisäämällä polaarisia liuottimia kuten vettä tai vesiliuosta kuivaan galaktolipidimateriaaliin siten, että lopulliset lipidipitoisuudet ovat alueella 25-90 % (p/p). Näiden seosten annetaan turvota 1-24 tuntia huoneen lämpötilassa samalla varovaisesti sekoittaen sopivassa astiassa, esimerkiksi lasipullossa tai avoimessa dekantterilasissa. Geelejä voidaan myös valmistaa lasiputkissa sekoittamalla sauvalla ja sentrifugoimalla huoneen lämpötilassa.

Nämä geelit ovat näennäisesti plastisia ja ne ovat huomattavan pysyviä fysikaalista ulkonäköä ja mikrobiologista kestävyyttä ajatellen. Kohtalaiset lämpötilamuutokset eivät vaikuta merkittävästi geelien viskositeetteihin ja näin ollen ne voidaan esimerkiksi siirtää suoraan jääkaapista neularuiskuun tai muuhun antovälineeseen.

Edelleen osoitetaan, että keksinnön mukaiset geelit voivat myös toimia niihin sisällytettyjä aktiivisia komponentteja hitaasti vapauttavana väliaineena, joka on tehokkaampi kuin fosfolipideistä tehdyt geelit.

Edelleen osoitetaan, että keksinnön mukaisiin geeleihin voidaan sisällyttää suuri joukko erilaisia, terapeuttisesti aktiivisia komponentteja, joista voidaan mainita lipofiiliset komponentit, hyydrokloridit, nitraatit, amfifiilit, proteiinit ja peptidit.

Erään toisen edullisen suoritusmuodon mukaisesti keksinnön kohteena on liposomivalmiste, joka käsittää 0,01-25 paino-% galaktolipidimateriaalia polaarisessa liuottimessa.

Näiden galaktosyyliasyyliglyserolien luontainen edullinen piirre on se, että galaktoosiyksiköt käsittävät polaarisen pääryhmän kussakin lipidimolekyylissä, mikä voi stabiloida steerisesti liposomit, ja millä voidaan näin ollen päästä pitempään elinikään verenkiertoon injektoituna.

Liposomit eli monilamelliset vesikkelit valmistetaan suoralla hydrataatiolla. Polaarista liuotinta kuten vettä tai vesiliuosta lisätään kuivaan galaktolipidimateriaaliin siten, että lopullinen lipidipitoisuus saadaan alueelle 0,01-25 % (p/p). Seosten annetaan turvota ja tasapainottua huoneen lämpötilassa 1-24 tuntia samalla varovasti sekoittaen, jolloin saadaan liposomidispersio. Liposomeja voidaan myös valmistaa lisäämällä ylimäärä polaarista liuotinta edellä kuvatulla tavalla valmistettuun geeliin, eli yksinkertaisesti laimentamalla geeliä.

Yksilamelliset vesikkelit valmistetaan monilamellisen vesikkelin dispersiosta esimerkiksi kalvoekstruusiolla tai suuripaineisella homogenisoinnilla.

Tämän galaktolipidimateriaalin epätavallisten ja yllättävien turpoamisominaisuuksien ansiosta on huomattavan helppoa valmistaa liposomidispersioita ja vesipitoisia geelejä. Esimerkiksi liposomien spontaani muodostuminen vedessä on yllättävän käyttökelpoinen tapahtuma myös silloin, kun liposomidispersioita valmistetaan suuressa mittakaavassa. Tämä eroaa niistä toimenpiteistä, joita tarvitaan liposomien muodostamiseksi fosfolipideistä, ja joissa toimenpiteissä käytetään orgaanisia liuottimia kuten kloroformia, eetteriä, etanolia tai niiden yhdistelmää. Tavanomaisten fosfolipidi-liposomi-valmisteiden mittakaavan suurentaminen on tunnistettu ongelma ja monia erilaisia menettelytapoja on ehdotettu näiden vaikeuksien voittami-

seksi. Tässä keksinnössä saadaan aikaan liposomidispersioita yksinkertaisella ja toistettavalla tavalla, millä saattaa olla merkitystä liposomien käytölle käytännössä, esimerkiksi lääkeaineiden kantajina.

On osoitettu, että keksinnön mukaisten liposomien kapselointiteho on yllättävän hyvä.

Edelleen on osoitettu, että keksinnön mukaiset liposomit pidentävät yllättävällä ja merkittävällä tavalla aktiivisten komponenttien kestoa siinäkin tapauksessa, että vesikkeleitä muodostetaan näiden komponenttien liuoksessa, ja jolloin näin ollen vesikkelit kapseloivat vain osan näistä komponenteista.

Edelleen on osoitettu, että keksinnön mukaiset liposomit vähentävät voimakkaan syöpälääkkeen toksisuutta sen farmakologista vaikutusta heikentämättä.

Keksinnön mukaiset liposomit ovat biologisesti kiinnittyviä ja tästä syystä ne voivat ratkaista sen ongelman, joka liittyy sisällytetyn aktiivisen komponentin riittävään saatavuuteen tietyillä biologisilla pinnoilla, esimerkiksi sarveiskalvolla ja limakalvolla.

Keksinnön mukaisiin liposomeihin voidaan sisällyttää yllättävän erilaisia aktiivisia komponentteja, joista voidaan mainita lipofiiliset komponentit, hydrokloridit, nitraatit, amfifiilit, proteiinit, peptidit ja muut.

Keksinnön mukaisesti voidaan käyttää synteettisiä diglykosyylidiasyyliglyseroleja, jotka perustuvat galaktoosi- tai mihin tahansa muuhun monosakkaridiyksikköön kuten glukoosiin, sekä mistä tahansa lähteestä eristettyihin luonnollisiin glykosyyliglyserideihin, jotka perustuvat muita hiilihydraatteja kuin galaktoosia oleviin yksikköihin kuten glukoosiyksikköihin.

Galaktolipidimateriaali

Galaktolipidimateriaaleja saadaan erilaisista viljakasveista jäljempänä kuvattavalla tavalla ja niitä käytetään keksinnön mukaisten kantajavalmisteiden ja farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi esimerkeissä kuvattavilla tavoilla. Tässä kuvauksessa % tarkoittaa painoprosenttia, mikäli toisin ei ole mainittu. Liuottimien osuus liuotinseoksissa on esitetty tilavuusosina.

Galaktolipidimateriaali kaurasta

200 kg kauranjyviä (Kungsörnen AB, Sweden) jauhettiin ja uutettiin 1000 litralla 95 % etanolia 70 °C:ssa 3 tuntia uuttosäiliössä samalla sekoittaen. Liete sentrifugoitiin vielä lämpimänä ja siitä erotettiin kiinteät hiukkaset. Nestefraktio haihdutettiin 60 °C:ssa, jolloin saatiin noin 10 kg kevyttä ruskeata öljyä.

Öljy laitettiin ruostumatonta terästä olevaan pylvääseen, joka sisälsi 6,25 kg silikageeliä (Matrex Silica Si, hiukkaskoko 20-45 mm, huokoskoko 60 Å, yhtiöstä Amicon Corp., USA). Pylvään lämpötila oli 50 °C. Sitten pylväs huuhdottiin 30 litralla heksaani:isopropanoli-seosta, 90:10, kaikkien ei-polaaristen lipidien poistamiseksi.

Sitten galaktolipidimateriaali eluoitiin pylväästä 20 litralla heksaani:isopropanoli-seosta, 60:40, jolloin saatiin galaktosyylidiasyyliglyserolifraktio. Tätä fraktiota haihduttamalla saatiin noin 700 g DGDG:tä, pääasiallinen lipidilluokka. Sitten tämä galaktolipidimateriaali dispergoitiin veteen ja se kylmäkuivattiin, jolloin saatiin vapaasti juoksevaa jauhetta.

DGDG:n rikastaminen galaktolipideistä

50 g edellä kuvatulla tavalla kaurasta saatuja galaktolipidejä, joissa DGDG-pitoisuus oli noin 70 %, liuotettiin 250 ml:aan heksaani:isopropanoli-seosta suhteessa 70:30, jolloin kokonaismääräksi saatiin 300 ml. Saatu liuos laitettiin silikageeliä (110 g) sisältävään pylvääseen ja vähemmän polaariset

aineosat eluoitiin 1 litralla heksaani:isopropanoli-seosta suhteessa 70:30. Rikastettu DGDG-jae eluoitiin 2 litralla asetonia. Asetonifraktio haihdutettiin ja kylmäkuivattiin. Kokonaissaanto oli 17 g lähes puhdasta DGDG-tuotetta.

Galaktolipidien hydraus

200 g kaurasta edellä kuvatulla tavalla saatua galaktolipidiseosta liuotettiin 2 litraan lämmintä isopropanolia. 15 g katalyyttinä toimivaa, hiileen sidottua palladiumia (Pd 15 %, kosteus 53 %, Engelhard Rome s.r.i., Italia) laitettiin painereaktorin pohjalle (Malli 4552M; Parr Instrument Co., USA), joka reaktori oli varustettu kahdella sekoitinakseliin kiinnitetyllä juoksupyörällä. Sitten tämä liuos siirrettiin reaktoriin käyttäen suojaavaa typpikerrosta tulipalovaaran välttämiseksi. Reaktoriastia suljettiin ja se paineistettiin ensimmäiset kolme kertaa typellä ilman poistamiseksi ja sitten kolme kertaa vetykaasulla (Plus 4.5, yhtiöstä AGA Gas AB, Ruotsi). Vetypaine pidettiin sitten 6 baarissa, sekoittimen nopeudeksi asetettiin 600 kierr./min ja seos kuumennettiin 70 °C:n lämpötilaan. 14 minuuttia kului siihen, että reaktioseos saavutti sille asetetun lämpötila-arvon. Hydrausprosessin annettiin edetä 6 tunnin ajan, minkä jälkeen reaktiotuote suodatettiin 0,45 μm:n suodattimen läpi hiilihiukkasten ja palladiumin poistamiseksi. Liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella, jäljelle jäänyt kiinteä materiaali dispergoitiin 1600 ml:aan ionittomaksi tehtyä vettä ja se kylmäkuivattiin.

Hydrattujen galaktolipidien saanto suodattamisen ja kylmäkuivaamisen jälkeen oli 155 g. Hydraava suorituskyky arvioitiin kaasukromatografisesti; hydratusta tuotteesta voitiin todeta vain tyydyttyneitä rasvahappoja.

Galaktolipidit vehnän gluteenista

1 kg jauhemaista vehnän gluteenia (AB Skånebränneries, Ruotsi) uutettiin 4 litralla 95 % etanolia 70 °C:ssa 3 tunnin ajan dekantterilasissa. Sitten tämä liete suodatettiin alueella 400-500 kPa olevassa paineessa ja saatu suodatuskakku pestiin

1 litralla lämmintä 95 % etanolia. Yhdistetyt etanoliliuokset haihdutettiin korkeintaan 60 °C:n lämpötilassa, ja tällöin saatiin 60 g keltaista öljyä.

Tämä öljy laitettiin ruostumatonta terästä olevaan pylvääseen, joka sisälsi 45 g silikageeliä (Matrex Silika Si, hiukkaskoko 20-45 µm, huokoskoko 60 Å, yhtiöstä Amicon Corp., USA). Sitten pylvästä huuhdottiin 700 ml:lla heksaani:isopropanoli-seosta, 90:10, neutraalien lipidien poistamiseksi.

MGDG:n ja eräiden muiden polaaristen lipidien poistamiseksi pylvästä huuhdottiin tämän jälkeen 1000 ml:lla heksaani:isopropanoli-seosta, 70:30. DGDG-eluutio toteutettiin 1000 ml:lla puhdasta asetonia. Haihduttamisen jälkeen saatiin noin 4 g lähes puhdasta DGDG-tuotetta.

Galaktolipidit rukiista

100 g ruishiutaleita (Kungsörnen AB, Ruotsi) sekoitettiin 60 minuuttia teollisen heksaanin ja isopropanolin välisessä seoksessa, 90:10. Tämä liete suodatettiin ja haihdutettiin, jolloin saatiin 0,5 g polaarisia lipidejä. Jäännös liuotettiin 10 ml:aan heksaanin ja isopropanolin seosta 70:30 ja liuosta laitettiin kolmeen peräkkäin kytkettyyn Sep-Pak Silica Plus-pylvääseen (Millipore Corp., USA), joita huuhdottiin 20 ml:lla samaa liuotinseosta ja joita eluoitiin 15 ml:lla asetonia. Eluaatti haihdutettiin ja kylmäkuivattiin ja saanto oli 47 mg galaktolipidejä.

Erilaisten galaktolipidimateriaalien kemialliset ja fysikaaliset tunnusomaiset piirteet

Lipidiluokka-analyysi

Lipidiluokka analysoitiin suuren suorituskyvyn nestekromatografisella eli HPLC-menetelmällä käyttäen pylvästä, johon oli pakattu diolilla modifioitua silikageeliä (LiChrosphere 100 DIOL, 5 µm, 250 mm x 4 mm, sisähalkaisija; E. Merck, Saksa). Pylväs upotettiin vesihauteeseen, jonka lämpötila pidettiin

arvossa 75 °C. Analyysijärjestelmä koostui HPLC-pumpusta CM 4000 (LDC/Milton Roy, USA) sekä injektiolaitteesta, malli 7125, jossa oli 20 µl:n injektiosilmukka (Rheodyne Inc., USA). Käytetty haihduttava ja valon sirontaan perustuva ilmaisin oli Sedex 45 (S.E.D.E.R.E., Ranska), joka oli varustettu Sedex 55-merkkisellä sumukammiolla, viiveputken lämpötilan ja ilman sisäänmenopaineen ollessa vastaavasti 97 °C ja 2,0 baaria.

Liikkuvan faasin virtaus oli 1 ml/min analyysin aikana. Analyysissä käytettiin kahden liuottimen gradienttia, joka oli lineaarinen ja jonka kesto oli 25 minuuttia, lähtien 100 %:sta liuotinta A ja päättyen 100 %:iin liuotinta B, liuottimen A ollessa heksaani:isopropanoli:n-butanoli:tetrahydrofuraani:-iso-oktaani:vesi, 64:20:6:4,5:4,5:1, ja liuottimen B ollessa isopropanoli:n-butanoli:tetrahydrofuraani:iso-oktaani:vesi, 75:6:4,5:4,5:10. Kaikki liuottimet sisälsivät ammoniumasetaattia, 180 mg/l.

Tietojen keruu ja käsittely toteutettiin GynkoSoft Data-järjestelmällä, versio 4.22 (Softron GmbH, Saksa). Tyypillinen analyysiä varten injektoitu määrä oli 100 µg. Tunnistus perustui vertaamalla retentioaikoja autenttisten standardien retentioaikoihin (Karlshamns LipidTeknik AB, Ruotsi). Haihtuvia yhdisteitä ei ilmaistu tällä järjestelmällä. Kvantitointi perustui piikkien pinta-alan laskemiseen.

Zeta-potentiaalit määritettiin galaktolipidien laimeilla vesidispersioilla käyttäen Zetasizer 4-instrumenttia (Malvern Instruments Ltd., UK).

Taulukko 1

Erilaisten galaktolipidimateriaalien tunnusomaiset piirteet

	o-GL		o-h-GL	o-DGDG	w-GL	w-DGDG	r-GL
DGDG-pit., pinta-ala, %	73	70	72	100	80	100	67
Z-potentiaali, mV	-74	-76	-30	-51	-75	-38	-37

Taulukossa 1 sekä alla olevassa taulukossa 2 on käytetty seuraavia lyhenteitä:

o-GL = galaktolipidit kaurasta
o-h-GL = hydratut galaktolipidit kaurasta
o-DGDG = rikastetut galaktolipidit kaurasta
w-GL = galaktolipidit vehnästä
w-DGDG = rikastetut galaktolipidit vehnästä
r-GL = galaktolipidit rukiista

Rasvahappoanalyysi

Rasvahappoprofiili analysoitiin kaasukromatografisesti sen jälkeen, kun lipidit oli vaihtoesteröity rasvahapon metyyliestereiksi. Ne erotettiin ja kvantitoitiin kapillaaripylvään avulla kaasukromatografisesti Varian 3500 Capillary Gas Chromatograph-kaasukromatografilla, joka oli varustettu kapillaaripylväällä, 30 m x 0,25 mm sisähalkaisija (DB-WAX; J&W Scientific, USA), pylvään päällä olevalla injektorilla ja liekki-ionisaatiodetektorilla. Heliumia käytettiin kantajakaasuna. Integrointi toteutettiin GynkoSoft Data-järjestelmällä, 4.22 (Softron GmbH, Saksa). Vaihtoesteröinti toteutettiin lisäämällä 1 mg lipidinäytettä 2 ml:aan dimetyylikarbonaatin ja isooktaanin seosta 1:1. Sitten lisättiin 1 ml liuosta, joka sisälsi 2,3 g natriumia liuotettuna 200 ml:aan metanolia ja koeputkea ravisteltiin voimakkaasti 30 s ja se jätettiin huoneen lämpötilaan 15 minuutiksi täydellisen reaktion takaamiseksi. 3 ml vettä lisättiin ja koeputkea ravisteltiin ja sitten se sentrifugoitiin nopeudella 2 x g. 0,5 µl orgaanista

kerrosta injektoitiin kromatografiin seuraavissa erotusolosuhteissa. Uuni lämpötilaohjelmoitiin, alkaen arvosta 130 °C (2 minuuttia), lämpötila nostettiin arvoon 150 °C (30°/min) ja arvoon 220 °C (3,2 °C/min), säilyttäen tämä arvo 10 minuuttia. Injektorin lämpötila oli 130 °C ja ilmaisimen lämpötila oli 250 °C. Kaasuvirtaus oli aluksi 2,7 ml/min. Tulokset on esitetty normalisoituina painoprosentuaalisina osuuksina käyttäen ulkoiseen standardiin perustuvaa menetelmää. Vähäisten aineosien, joille ei ole saatavana standardeja tai jotka standardit eivät ole riittävän puhtaita, korjaustekijöitä ei käytetty.

Taulukko 2

Rasvahappokoostumuksen tunnusomaiset piirteet

Rasvahappo-koostumus, paino-%	o-GL		o-h-GL	o-DGDG	w-GL	w-DGDG	r-GL
C 14:0						1	
C 16:0	20	21	21	16	15	13	12
C 18:0	1	1	74	2	1	1	
C 18:1 *n-9*	17	17		19	6	5	8
C 18:1 *n-7*	1	1		1	1	1	1
C 18:2 *n-6*	53	52		58	71	68	69
C 18:3 *n-3*	2	2		3	3	3	5
Vähäiset aineosat, < 1 % ja tunnistamattomat aineosat	6	6	5	1	3	8	5

Digalaktosyylidiasyyliglyserolien NMR-spektroskopia

Protonista irtikytkeytyneen C^{13}:n luonnolliseen runsauteen perustuvat yksiulotteiset NMR-spektrit määritettiin Bruker AM-400-spektrometrillä (Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Saksa) käyttäen 100,614 MHz:n suuruista ^{13}C-taajuutta. Pulssikulma oli 36°, pulssin toistoaika oli 1,0 s ja erotuskyky 1,526 Hz tietopistettä kohden. 3 Hz:n viivan levennystä käytettiin käsittelyn aikana. Näytteet (10-40 mg) laimennettiin seoksessa, joka sisälsi 730 μl DMSO-d_6:ta (Aldrich Chemical Coomp., Inc., USA) ja 20 μl D_2O:ta (Aldrich Chemical Comp., Inc., USA), ja ne siirrettiin NMR-putkeen (5 mm sisähalkaisija).

Taulukko 3

^{13}C:n kemialliset siirtymät (ppm) vehnästä ja kaurasta saaduissa digalaktosyylidiasyyliglyseroleissa

Signaali	w-DGDG	o-DGDG
Rasvahappo-osa		
C(n)	13,8	13,7
C(n-1)	21,9	21,9
C(n-2)	30,8	30,8
C, metyleeni	28,3-28,9	28,4-29,0
C, allyyli	26,5	26,5
C, kaksinkert. allyyli	25,1	25,1
C, olefiini	127,6-129,6	127,6-129,5
C3	24,3	24,3
C2	33,3, 33,5	33,3, 33,5
C1	172,2, 172,5	171,1, 172,4
Glyseroliosa		
sn-1	62,3	62,4
sn-2	69,8	69,8
sn-3	66,6	66,6
Digalaktosyyliosa		
C1 (sisempi)	103,6	103,6
C1' (ulompi)	99,4	99,4
muut	60,4, 66,3 67,7, 68,2 68,6, 69,3 70,1, 71,1 72,8, 72,8	60,4, 66,3 67,7, 68,2 68,6, 69,3 70,1, 71,1 72,8, 72,9

Esimerkki 1

Vesipitoisen geelin muodostus

Kaurasta saatuun galaktolipidimateriaaliin sekoitettiin erilaisia määriä vettä vedessä turpoavuuden määrittämiseksi. Lipidi-vesi-näytteitä valmistettiin painon mukaan lasiputkissa. Näitä näytteitä käsiteltiin vuorotellen sekoittamalla sauvalla ja sentrifugoimalla huoneen lämpötilassa, kunnes muodostui näennäisesti homogeenisia järjestelmiä. Näytteiden fysikaalinen ulkonäkö arvioitiin sen jälkeen, kun niitä oli säilytetty kuusi kuukautta huoneen lämpötilassa. Lamellaarinen nestekidefaasi ilmaistiin polarisoivalla valomikroskoopilla. Tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon:

Galaktolipidi-materiaali	Ulkonäkö
1,0	Hieno dispersio; vähäistä laskeutumista
4,8	Hieno dispersio; vähäistä laskeutumista
10,5	Lamellisella + vesifaasilla yhtäsuuri tilavuus
19,3	Lamellinen + vesifaasi; vesifaasin tilavuus <10 til.-%
24,8	Lamellinen faasi
45,0	Lamellinen faasi

Tämä tarkoittaa sitä, että homogeeninen yksifaasinen geeli muodostui, kun galaktolipidin pitoisuus oli noin 25 % ja sitä suurempi.

Esimerkki 2

Vesipitoisen geelin viskositeettiominaisuudet

55 % vettä sisältävä galaktolipidigeeli valmistettiin esimerkin 1 mukaisesti. Viskositeettimittaukset toteutettiin Bohlin VOR-reometrilla (Bohlin Reologi AB, Ruotsi), joka oli varustettu samankeskisellä sylinterillä (C14; vääntöelementti: 91 gcm), käyttäen erilaisia leikkausnopeuksia ja lämpötiloja. Viskositeetti mitattiin 24 tuntia valmistuksen jälkeen. Muuttumattoman virtauksen viskositeettiarvot (yksikössä Pas) on koottu alla olevaan taulukkoon:

Leikkausnopeus, 1/s	20 °C	40 °C	60 °C
0,292	98,8	84,5	77,0
0,581	65,7	54,5	42,1
2,312	46,0	34,0	19,5
9,207	37,4	29,6	15,0

Pääteltiin, että näyte oli leikkausvoimien vaikutuksesta oheneva (näennäisplastinen), eli sen viskositeetti riippui leikkausnopeudesta, tällaisen reologisen käyttäytymisen ollessa tyypillistä lamellisille nestekidefaaseille. Edelleen, lämpötilan suureneminen johti ainoastaan viskositeetin vähäiseen pienenemiseen, mikä osoitti faasisiirtymien puuttumisen tutkitulla lämpötila-alueella. Sen jälkeen, kun geeliä oli säilytetty 18 kuukautta huoneen lämpötilassa, se tutkittiin silmämääräisesti. Mikrobikasvua ei voitu todeta. Fysikaalinen ulkonäkö ei muuttunut säilytyksen aikana, mikä on huomattavaa, sillä mihinkään varotoimenpiteisiin ei ryhdytty säilytyslämpötilan, antioksidanttien, säilöntäaineiden tai vastaavien suhteen.

Tämä osoittaa galaktolipidimateriaalin erinomaisen stabiilisuuden myös vesipitoisessa ympäristössä, joka saattaa aiheuttaa esimerkiksi asyyliketjujen hydrolyysiä tai mikrobiologista hajoamista.

Esimerkki 3
Vapautumiskoe

Vesiliukoisen väriaineen eli metyleenisinisen (E. Merck, Saksa) in vitro-vapautumiskokeet toteutettiin galaktolipidi- ja fosfolipidigeeleillä, jotka sisälsivät alunperin 60 % lipidiä ja 50 mM metyleenisinistä. Galaktolipidimateriaali valmistettiin kaurasta. Fosfolipidi oli soijapavuista saatua, kromatografisesti puhdistettua fosfatidyylikoliinia (s-PC; Karlshamns LipidTeknik AB, Ruotsi). Diffuusioväliaine oli kalvosuodatettua vettä, jota oli tasapainotettu 37 °C:ssa. Diffuusiokenno oli regeneroitua selluloosaa oleva kalvoputki (Spektra/Por;

molekyylipainon erotusraja ("cut-off"): 6000-8000; leveys litistettynä: 1,0 cm), joka sisälsi noin 2,5 g geeliä. Putki oli upotettu termostoituun dekantteriin (sisähalkaisija 10 cm), joka sisälsi 250 g väliainetta, kiinteään asemaan noin 3 cm:n päähän pohjasta. Dekantteri laitettiin magneettisekoittimen päälle, asettaen pyörimisnopeus arvoon 200 kierr./min. Väliaineesta otettiin näytteitä tiettyinä ajanhetkinä ja ne analysoitiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 665 nm. Viitteenä mitattiin metyleenisinisen vapautuminen selluloosaputkesta, joka sisälsi 50 mM metyleenisinisen vesiliuosta.

2,5 tunnin kuluttua ei voitu todeta värin vapautumista galaktolipidigeelistä, kun taas 1,3 % oli vapautunut s-PC-geelistä. Viiden tunnin kuluttua galaktolipidigeeli oli vapauttanut vain 0,13 % sen sisältämästä väristä, mikä oli noin 12 kertaa vähemmän kuin s-PC-geelistä vapautunut määrä.

Tämä osoittaa, että galaktolipidivalmiste johtaa bioaktiivisen materiaalin hitaaseen vapautumiseen in vivo annettuna, ja näin ollen sitä voidaan käyttää varastovalmisteena.

Esimerkki 4
Vapautumiskoe

Vesiliukoisen lääkeaineen eli remoksipridi-hydrokloridi-monohydraatin (Astra AB, Ruotsi) in vitro-vapautumiskoe toteutettiin galaktolipidigeelillä, joka sisälsi alunperin 60 % lipidiä, 15 % remoksipridi-hydrokloridia ja 25 % vettä.

Diffuusion väliaine oli fosfaattipuskuri (pH 7,4; ionivahvuus 0,05 M), jota oli tasapainotettu 37 °C:ssa. Diffuusiokenno oli regeneroidusta selluloosasta tehty kalvoputki (Spectra/Por 3; molekyylipainon erotusraja 3500; leveys litistettynä 1,0 cm; pituus 4 cm), joka sisälsi noin 1 ml:n geeliä. Putken molemmat päät suljettiin painokiinnittimellä ja se laitettiin termostoidun liuotushauteen pohjalle (Sotax AT 6; sisähalkaisija 10 cm), joka haude sisälsi 600 ml fosfaattipuskuria. Tätä pusku-

riliuosta sekoitettiin pyörivällä potkurilla, nopeudella 50 kierr./min. Yhden ml:n suuruinen näyte otettiin ennalta määrätyillä ajanhetkillä ja analysoitiin. Tämä näyte korvattiin 1 ml:lla puskuria. Remoksipridin pitoisuus määritettiin käänteisfaasin avulla nestekromatografisesti, pylvään ollessa μ-Bondapak C18. Käytetty eluentti oli fosfaattipuskurin, pH 1,8, ja asetonitriilin 4:1-seos. Spektrofotometristä ilmaisinta käytettiin ja aallonpituus oli 254 nm.

Geeli johti sisällytetyn lääkeaineen yllättävän hitaaseen vapautumiseen. Kahden tunnin kuluttua vähemmän kuin 2 % sisällytetystä lääkeaineesta oli vapautunut galaktolipidigeelistä. Noin 3 % oli vapautunut 4 tunnin kuluttua.

Tämän perusteella voidaan päätellä, että galaktolipidivalmiste sopii ruuansulatuskanavan ulkopuoliseksi varastoksi, joka vapauttaa pitkitetysti bioaktiivista materiaalia, josta esimerkkinä on käytetty ohessa remoksipridi-hydrokloridia.

Esimerkki 5

Liposomien muodostaminen

Liposomeja eli monilamellisia vesikkeleitä valmistettiin ja niiden tunnusomaiset piirteet selvitettiin seuraavalla tavalla. Vettä lisättiin kaurasta saatuihin galaktolipideihin siten, että lopulliseksi lipidipitoisuudeksi saatiin 1,0 ja 10,0 %. Näytteiden annettiin tasapainottua huoneen lämpötilassa 24 tuntia samalla varovasti sekoittaen, jolloin saatiin liposomidispersioita.

Yksilamellisten vesikkelien valmistamiseksi osa tästä dispersiosta siirrettiin lasiputkeen ja murskattiin ultraäänilaitteella (XL-2020; Heat Systems Inc., USA), joka oli varustettu mikrokärkikoettimella, typen alla 0 °C:ssa. Seuraavia asetusarvoja käytettiin: tehon säätö 3,5, prosessiaika 3x2 min., pulssin lepoaika 2x4 min.

Tuloksena olleiden liposomidispersioiden hiukkaskokojakauma määritettiin dynaamisen valosironnan avulla (Zetasizer 4, Malvern Instruments, UK) 90° kulmassa ja huoneen lämpötilassa, käyttäen ZET5110-koonmäärityskennoa ja multimodaalista analyysia. Tällä tavalla saatiin seuraavat tulokset Z-keskiarvoina:

Ennen ultraäänikäsittelyä	Koko, nm
1,0 % dispersio	467
10,0 % dispersio	551
Ultraäänikäsittelyn jälkeen	
1,0 % dispersio	144
10,0 % dispersio	148

Näin saadut dispersiot tarkasteltiin optisella mikroskoopilla (40-100x, Olympus, CH-2, Japani) ennen ultraäänikäsittelyä ja ultraäänikäsittelyn jälkeen. Pieni määrä liposomidispersiota laitettiin lasilevylle. Sitten näytteen ulkonäköä tutkittiin ristikkäin olevien polarisaattoreiden välissä. Ainoastaan ultraäänellä käsittelemättömät liposomit voitiin todeta, joilla liposomeilla oli tunnusomainen Maltan ristin muoto. Samoin galaktolipidien kyky muodostaa vesikkeleitä varmistettiin jäätymismurtumaan perustuvalla transmissioelektronimikroskopialla.

Nämä tulokset osoittavat, että galaktolipidit kykenevät erinomaisesti muodostamaan monilamellisia vesikkeleitä käyttäen yksinkertaista suoraa hydrataatiomenetelmää, lisäämättä haihtuvia orgaanisia liuottimia tai muita pinta-aktiivisia aineita. Tällöin pieniä yksilamellisia vesikkeleitä voidaan muodostaa helposti ultraäänikäsittelyllä, kuten edellä on kuvattu, tai millä tahansa muulla tavanomaisella tavalla, esimerkiksi ekstruusiolla polykarbonaattikalvon läpi.

Esimerkki 6
Kapselointiteho

Kaurasta valmistetulla galaktolipidimateriaalilla oleva, vesikkeleihin sisällytettyä väriä kapseloiva teho selvitettiin. Galaktolipidimateriaali hydratoitiin suoraan fluoreseiinin 20 mM vesiliuoksessa, 4,8 %:n pitoisuudeksi. Tämän dispersion annettiin turvota 24 tuntia huoneen lämpötilassa.

Väriä sisältävät vesikkelit erotettiin vapaaksi jääneestä väristä geelisuodattamalla Sephadex G 50-pylväällä (korkeus 60 cm, sisähalkaisija 1,5 cm) huoneen lämpötilassa. Eluenttina käytettiin EDTA-puskuria (1 mM EDTA, 5 mM Tris, 150 mM NaCl), pH asetettu arvoon 7,4. Voimakasta väriä sisältävä liposomidispersio laitettiin pylvään petiin, minkä jälkeen pylvästä eluoitiin puskuroidulla EDTA-liuoksella. Pylvään eluenttia seurattiin jatkuvasti aallonpituudella 240 nm UV-spektrofotometrillä, joka oli varustettu mikrovirtauskennolla ja piirturilla, ja tämä eluentti kerättiin fraktioiden automaattisella kerääjällä. Kaksi fraktiota eli väriä sisältävät vesikkelit ja pidättymätön väriliuos kerättiin toisistaan riippumatta ja fraktioiden tilavuus asetettiin määrättyyn arvoon. Värin pitoisuudet määritettiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 285,2 nm ja saaduista tuloksista laskettiin pidättynyt tilavuus ja kapselointiteho. Seuraavat tulokset saatiin: pidättynyt tilavuus 2,1 μl/mg lipidiä ja kapselointiteho 11 %. Vesikkelien kooksi määritettiin 509 nm ((Z-keskarvo).

Galaktolipidien suora hydrataatio johtaa monilamellisten vesikkeleiden muodostumiseen, kuten esimerkissä 5 on kuvattu. Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että näillä vesikkeleillä on paljon suurempi pidättynyt tilavuus ja parempi kapselointiteho kuin tavanomaisilla, fosfolipideihin perustuvilla vesikkeleillä, joiden tapauksessa pidättyneeksi tilavuudeksi on esitetty noin 0,5 μl/ml lipidiä.

Tämä suora hydrataatiomenetelmä monilamellisten vesikkeleiden tuottamiseksi on teknisesti yksinkertainen ja nopea menetelmä ja näin ollen sitä voidaan käyttää teollisesti. Kun tätä menetelmää sovelletaan galaktolipidimateriaaliin, niin tällöin on mahdollista saavuttaa paljon suurempi pidättynyt tilavuus, eli paljon parempi kapselointiteho, mikä on ollut aikaisemmin pääasiallinen haitta käytettäessä fosfolipidejä monilamellisten vesikkeleiden tuottamiseksi.

Esimerkki 7
Vesidispersioiden muodostaminen

Kaurasta saatu rikastettu galaktolipidimateriaali, DGDG sekoitettiin veteen vedessä turpoavuuden testaamiseksi. Lipidi-vesi-näytteet valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Tulokset on koottu seuraavaan taulukkoon:

Rikastettu galaktolipidi	Ulkonäkö
1,1	Hieno maitomainen dispersio
9,6	Hieman viskoosi maitomainen dispersio
21,2	Viskoosi maitomainen dispersio

Samoin kuin rikastamattoman materiaalin tapauksessa rikastetun materiaalin turpoavuus vedessä oli äärimmäisen hyvä ja homogeenisia dispersioita muodostui helposti.

Esimerkki 8
Vesidispersioiden muodostus

Kaurasta saatua hydrattua galaktolipidimateriaalia sekoitettiin veteen vedessä turpoavuuden testaamiseksi. Lipidi-vesi-näytteet valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

Hydrattu galaktolipidi	Ulkonäkö
1,3	Hieno valkoinen dispersio
5,7	Hieman viskoosi valkoinen dispersio
10,2	Viskoosi valkoinen dispersio

Samoin kuin hydraamattoman materiaalin tapauksessa hydratun materiaalin turpoavuus vedessä oli äärimmäisen hyvä. Tämä materiaali sisältää vain tyydyttyneitä rasvahappojäännöksiä, mikä tarkoittaa sitä, että saadaan erittäin järjestäytynyt, kiteinen rakenne sekä kuivassa tilassa että veden läsnäollessa. Vedessä dispersiona olevan hydratun materiaalin ketjun sulamispiste oli noin 55 °C määritettynä differentiaalisella skannaavalla kalorimetrisellä menetelmällä. Vastaava arvo hydraamattoman materiaalin tapauksessa oli selvästi alle 0 °C.

Esimerkki 9

Vedettömän viskoosin dispersion valmistus

Viskoosit dispersiot valmistettiin seuraavien valmistusohjeiden mukaisesti:

Aineosa	%
Galaktolipidit	10,0
Glyseroli, 99 %	90,0

Aineosa	%
Galaktolipidit	20,0
Glyseroli, 99 %	80,0

Kaurasta valmistettuja galaktolipidejä sekä glyserolia käsiteltiin vuorotellen sekoittamalla sauvalla ja sentrifugoimalla huoneen lämpötilassa niin kauan, että muodostui hyvin viskooseja, homogeenisia ja näennäisesti isotrooppisia nesteitä. Kummatkin nesteen koostuivat lamellifaasin dispersiosta glyserolissa, eli monilamellisista vesikkeleistä, polarisoivalla valomikroskoopilla selvitetyn rakenteen perusteella. Näyttei-

den fysikaalista ulkonäköä tutkittiin sen jälkeen, kun niitä oli säilytetty yksi vuosi huoneen lämpötilassa. Laskeutumista ei voitu todeta, galaktolipidin pitoisuudesta riippumatta, mikä osoittaa, että glyserolilla on vesikkelidispersiota stabiloiva vaikutus.

Esimerkki 10

Vedettömän valmisteen valmistus, jolla valmisteella parannetaan limakalvon tilaa

Sulfhydryyliä sisältävät aineet kuten DL-kysteiini ja N-asetyyli-L-kysteiini voi stimuloida ihmisessä pohjukkaissuolen haavauman paranemista ja estää tällaisen haavauman uusiutumisen. Mahahaava voi syntyä verettömyyden tai myrkyllisten aineiden kuten etanolin ja asetyylisalisyylihapon vaikutuksesta, jotka aineet vahingoittavat ja poistavat pohjukkaissuolen limakalvoa.

Valmiste tehtiin käyttäen seuraavia aineosia:

Aineosa:	%
Galaktolipidit kaurasta	10,0
N-asetyyli-L-kysteiini	10,0
Glyseroli, 99 %	80,0

N-asetyyli-L-kysteiini liuotettiin glyseroliin samalla varovasti sekoittaen ja kuumentaen noin 60 °C:n lämpötilaan avoimessa dekantterissa. Sitten lisättiin galaktolipidimateriaali, ja tuloksena saatu, näennäisesti kirkas neste siirrettiin lasiastiaan, jossa oli muovikansi. Tätä valmistetta, joka todettiin dispersioksi polarisoivalla valomikroskoopilla, säilytettiin jääkaapissa yli 6 kuukautta.

Glyseroli valittiin liuottimeksi, koska sulfhydryyliä sisältävät aineet kuten N-asetyyli-L-kysteiini ovat pysymättömiä vesiliuoksessa, jossa ne voivat muuttua aineiksi, joilla ei ole farmakologista vaikutusta limakalvoon.

Galaktolipidimateriaali on edullista itsessään, sillä rotilla toteutetuissa in vivo-tutkimuksissa on todettu, että sillä on mahan limakalvoa suojaavaa vaikutusta.

Esimerkeissä 11-14 kuvatulla tavalla valmistettiin erilaisia paikallisesti käytettäviä valmisteita, jotka sisältävät hydrokortisonia, joka on tulehduksia torjuva aine. Galaktolipidimateriaali oli saatu kaurasta. Kaikki valmisteet olivat pysyviä yli 2 kuukautta huoneen lämpötilassa.

Esimerkki 11

Aineosa	%
Galaktolipidit	10,3
Hydrokortisoni	1,0
Vesi	88,7

Hydrokortisoni ja galaktolipidit sekoitettiin hyvin pyörresekoittimessa. Veden lisäämisen jälkeen valmistetta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla, sentrifugoimalla ja lämmittämällä varovasti, kunnes saatiin hieno maitomainen dispersio.

Esimerkki 12

Aineosa	%
Galaktolipidit	22,1
Hydrokortisoni	1,2
1-propanoli	16,1
Vesi	60,6

Hydrokortisoni liuotettiin 1-propanoliin varovasti lämmittäen ja sekoittaen. Veden ja galaktolipidien lisäämisen jälkeen seosta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla, sentrifugoimalla ja lämmittämällä varovasti, kunnes saatiin läpinäkymätön, hyvin viskoosi geeli.

Esimerkki 13

Aineosa	%
Galaktolipidit	18,9
Hydrokortisoni	0,8
1,2-propaanidioli	26,3
Vesi	54,0

Hydrokortisoni liuotettiin 1,2-propaanidioliin varovasti lämmittäen ja sekoittaen. Veden ja galaktolipidien lisäämisen jälkeen seosta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla, sentrifugoimalla ja lämmittämällä varovasti, kunnes saatiin kellertävä, lähes läpinäkyvä geeli.

Esimerkki 14

Aineosa	%
Galaktolipidit	26,8
Hydrokortisoni	1,2
Etanoli	20,7
Vesi	51,3

Hydrokortisoni liuotettiin etanoliin varovasti lämmittäen ja sekoittaen. Veden ja galaktolipidien lisäämisen jälkeen seosta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla, sentrifugoimalla ja lämmittämällä varovasti, kunnes saatiin vaalean ruskehtava läpinäkyvä geeli.

Esimerkeissä 15-17 kuvataan erilaisia vedettömiä, paikallisesti käytettäviä valmisteita. Nytkin hydrokortisoni valittiin mallilääkeaineeksi. Galaktolipidit on saatu kaurasta. Kakki valmisteet olivat pysyviä yli 2 kuukautta huoneen lämpötilassa.

Esimerkki 15

Aineosa	%
Galaktolipidit	7,0
Hydrokortisoni	0,8
Glyseroli, 99 % (p/p)	92,2

Galaktolipidit dispergoitiin glyseroliin. Sen jälkeen, kun oli saatu homogeeninen geelifaasi, hydrokortisoni lisättiin. Seosta lämmitettiin varovasti ja sitten sitä sekoitettiin pyörresekoittimella. Tuloksena saatu valmiste, joka oli suspensio, oli kellertävä, viskoosi geeli, joka sisälsi hienojakoisia kiinteitä hydrokortisonihiukkasia.

Esimerkki 16

Aineosa	%
Galaktolipidit	13,5
Hydrokortisoni	1,1
Glyseroli, 99 % (p/p)	85,4

Tämä valmiste valmistettiin esimerkin 15 mukaisesti. Tuloksena ollut valmiste oli läpinäkymätön, erittäin viskoosi geeli, joka oli väriltään vaalean keltaista.

Esimerkki 17

Aineosa	%
Galaktolipidit	21,8
Hydrokortisoni	1,1
Propanoli	14,5
Glyseroli, 99 % (p/p)	62,6

Hydrokortisoni liuotettiin osittain propanoliin samalla varovasti lämmittäen ja sekoittaen. Galaktolipidien lisäämisen ja voimakkaan sekoittamisen jälkeen lisättiin glyseroli. Sitten valmistetta pyörresekoitettiin, se sentrifugoitiin ja sitä läm-

mitettiin, kunnes muodostui kellertävä geelimäinen faasi. Geeli sisälsi hienojakoisia hydrokortisonihiukkasia.

Esimerkki 18

Emättimessä käytettävä, sieniä torjuva valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	45,6
Mikonatsolinitraatti	1,8
Vesi	52,6

Mikonatsolinitraatti ja kaurasta saadut galaktolipidit sekoitetaan hyvin pyörresekoittimella. Veden lisäämisen jälkeen valmistetta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla ja sekoittamalla, kunnes saatiin ruskehtava, homogeeninen ja erittäin viskoosi geeli.

Esimerkki 19

Haavapeitteenä käytettävä, bakteereita torjuva valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	42,8
Doksisykliini-hydrokloridi	1,7
Vesi	55,5

Doksisykliini-hydrokloridi liuotettiin veteen keltaiseksi liuokseksi. Kaurasta saatujen galaktolipidien sekoittamisen jälkeen seosta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla ja sekoittamalla, kunnes saatiin vaalean ruskehtava, homogeeninen ja erittäin viskoosi geeli.

Esimerkki 20

Ulkokorvakäytävässä käytettävä, bakteereita torjuva valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	2,0
Doksisykliini-hydrokloridi	2,0

Vesi	96,0

Doksisykliini-hydrokloridi liuotettiin veteen keltaiseksi liuokseksi. Kaurasta saatujen galaktolipidien sekoittamisen jälkeen seosta pyörresekoitettiin, kunnes saatiin keltainen ja maitomainen, doksisykliiniä sisältävien vesikkeleiden dispersio.

Esimerkki 21

Nenän kautta annettava, sokeritautia hoitava valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	3,5
Insuliiniliuos, 100 IU/ml (Actrapid Human, Novo Nordisk AS, Tanska)	96,5

Kaurasta saatuja galaktolipidejä hydratoitiin 24 tunnin ajan kaupallisessa insuliiniliuoksessa, samalla varovasti sekoittaen. Tuloksena ollut dispersio siirrettiin tavanomaiseen nenäpumppupulloon, jonka avulla voitiin tuottaa hieno aerosolisuihku.

Esimerkki 22

Siittiösoluja tappava valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	22,5
Nonoksinoli	5,0
Vesi	72,5

Näiden kolmen komponentin seosta käsiteltiin vuorotellen pyörresekoittamalla, sentrifugoimalla ja lämmittämällä varovasti, kunnes saatiin vaalean ruskehtava, läpinäkyvä geeli.

Esimerkki 23

Peräsuolen kautta annettava, kipua poistava valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	43,4
Parasetamoli	2,9
Vesi	53,7

Kaurasta saadut galaktolipidit ja parasetamoli sekoitettiin hyvin, Veden lisäämisen jälkeen valmistetta käsiteltiin vuorotellen sekoittamalla sauvalla, lämmittämällä varovasti ja sentrifugoimalla sitten huoneen lämpötilassa, kunnes saatiin kellanruskeata, erittäin viskoosia geeliä.

Kohtalaiset lämpötilamuutokset eivät vaikuta merkittävällä tavalla galaktolipidivalmisteiden viskositeettiin. Jääkaapissa pidetty valmiste voidaan siirtää helposti ruiskuun tai muuhun samankaltaiseen välineeseen, jolla sitä voidaan antaa tämän jälkeen peräsuoleen, jossa se lämpenee elimistön lämpötilaan viskositeettiaan tai jähmeyttään menettämättä.

Esimerkki 24
Silmissä käytettävä, viherkaihia torjuva valmiste

Aineosa	%
Galaktolipidit	1,00
Timololi-maleaatti	0,34
Vesi	98,66

Kaurasta valmistetut galaktolipidit dispergoitiin osaan vettä ja niiden annettiin turvota yön yli samalla varovasti sekoittaen huoneen lämpötilassa. Veden loppuosaan liuotettu timololimaleaatti lisättiin ja tuloksena ollut liposomidispersio siirrettiin lasiputkeen ja rikottiin ultraäänikäsittelyllä (XL-2020; Heat Systems Inc., USA; tehon säätö 4), joka oli varustettu mikrokärkikoettimella, typen alla 0 °C:ssa 10 minuuttia.

Tällä tavalla saatiin kirkas dispersio, joka sisälsi pieniä yksilamellisia vesikkeleitä sekä lääkeainetta farmakologisesti tehokkaana määränä, ja jota on tarkoitus käyttää silmätippa-

valmisteena. Galaktolipidien tehtävänä on sekä suurentaa valmisteen viskositeettia että parantaa biologista tarttuvuutta, jolloin tuloksena voi olla lääkeaineen parempi biologinen saatavuus sen ansiosta, että lääkeaine viipyy kauemmin sarveiskalvolla.

Esimerkki 25

Gamma-linoleenihapon litiumsuolan sisällyttäminen galaktolipidiliposomeihin

Syöpälääkkeenä käyttökelpoista gamma-linoleenihapon litiumsuolaa sisältävä liposomaalinen galaktolipidivalmiste valmistettiin seuraavalla tavalla.

Aineosa	%
Li-GLA	1,5
Rikastettu galaktolipidi	10,0

2,3 % glyseroli vedessä, lisätään 100,0 prosentiksi

Li-GLA, jossa gamma-linoleenihapon pitoisuus oli 75 %, saatiin yhtiöstä Callanish, Ltd., Skotlanti. Kaurasta saatu rikastettu galaktolipidimateriaali ja Li-GLA sekoitettiin yhteen ja sitten lisättiin 2,3-prosenttinen glyseroliliuos. Seoksen annettiin hydratoitua (tai turvota) 8 tuntia. Sen jälkeen, kun liposomidispersiota oli sekoitettu suuria leikkausvoimia käyttäen, nopeudella 12 000 kierr./min 30 sekunnin ajan, tätä liposomidispersiota homogenoitiin 86 MPa:n paineessa 3 minuuttia (EmulsiFlex-C30, Avestin Inc., Kanada). 1,5 % oleva Li-GLA-pitoisuus vastaa 53 mM olevaa pitoisuutta.

Tämän liposomidispersion hemolyyttinen vaikutus testattiin in vitro, kuten alla olevassa kokeessa 6 on esitetty.

Esimerkki 26

10 % L-tyrosiinia sisältävän dispersion valmistus

Dispersio valmistettiin seuraavalla tavalla:

Aineosa	%
Galaktolipidit kaurasta	6,4
L-tyrosiini	10,0
Vesi	83,6

Kaikki aineosat yhdistettiin ja niitä sekoitettiin suurten leikkausvoimien avulla, nopeudella 15 000 kierr./min. 4 minuuttia homogeenisen dispersion muodostamiseksi. Muodostettu dispersio oli stabiili useita viikkoja valmistuksen jälkeen.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 esittää glyserolissa olevien liposomien, jotka valmistettiin esimerkissä 9 10 %:sta (p/p) galaktolipidejä, mikrovalokuvakuviota polarisoidussa valossa, 100-kertaisena suurennuksena. Maltan ristin kaltaiset pallomaiset muodot ovat liposomien tunnusomaisia piirteitä.

Kuvio 2 esittää paikallisella anestesialääkkeellä olevaa, hermoa salpaavaa vaikutusta rottakokeessa, jossa käytetyillä rotilla oli henkitorven sisäinen pitkäaikainen istute, kuten jäljempänä kokeessa 3 on esitetty.

Biologiset kokeet

Koe 1
Ihon ärsyyntyminen in vivo

Seuraavalla kokeella arvioitiin keksinnön mukaisten galaktolipidien myrkyllisyys iholla.

Kaurasta saadut galaktolipidit sekoitettiin injektoitavaksi sopivaan veteen 10 % geeliksi ja niitä laitettiin 0,5 ml:n suuruisena annoksena eläintä kohden kuuden valkoisen uusiseelantilaisen uroskaniinin terveelle iholle ja pidettiin iholla puolittain sulkevan siteen alla neljä tuntia. Sitten ihon

punoitus ja turvotus määritettiin 1, 24, 48 ja 72 tuntia siteen poistamisen jälkeen. Sitten ihovaurioiden arvioinnin perusteella laskettiin keskiarvot 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 5.

Taulukko 5
Kaniinin ihon ärsyyntyminen

	Punoitus	Turvotus
24 tuntia	0	0
48 tuntia	0	0
72 tuntia	0	0

Tämän perusteella voidaan päätellä, ettei galaktolipidigeelin käyttö saa aikaan mitään huomattavaa ärsytystä.

Koe 2
Galaktolipidiliposomien in vivo-häviämisen arviointi

^{3}H-rasvahapolla merkityn DGDG:n valmistus

500 mg:n suuruinen määrä kaurasta saatuja galaktolipidejä merkittiin tritiumilla siten, että rasvahapporyhmissä olevat kaksoissidokset pelkistettiin katalyyttisesti tritiumkaasulla (Amersham Tritium Labeling Service, UK). Ominaisaktiivisuus oli 30-60 Ci/mmol pelkistettyä kaksoissidosta kohden. ^{3}H-DGDG puhdistettiin kaksiulotteisella ohutkerroskromatografialla, käyttäen silikageeli 60-levyjä. Liikkuvana faasina käytettiin ensimmäiseen suuntaan kloroformi:metanoli:vesi-seosta, 65:25:4 (til./til.), ja toiseen suuntaan kloroformi:metanoli:etikkahappo:vesi-seosta,85:15:10:3,5 (til./til.). DGDG-täplä eluoitiin peräkkäin kloroformi:metanoli:vesi-seoksella, 65:25:4 (til./til.) ja 50:50:10-seoksella (til./til.), puhtaalla metanolilla ja metanoli:vesi-seoksella, 1:1 (til./til.). ^{3}H:n osuus galaktolipidimolekyylin lipofiilisessa osassa määritettiin seuraavasti: 18 nCi ^{3}H-merkittyä DGDG:tä ja 2 mg merkitsemätöntä materiaalia alistettiin alkaliseen hydrolyysiin 1

ml:ssa 1 M KOH:ta, 60 °C:ssa 4 tunnin ajan. Sen jälkeen, kun neutralointi oli toteutettu 0,2 ml:lla 5 M HCl-liuosta, seokseen lisättiin 5 ml kloroformia, 1,5 ml etanolia ja 2,5 ml vettä. Tässä kaksifaasisessa osituksessa 97 % radioaktiivisuudesta siirtyi alempaan (kloroformi-) faasiin.

Merkitsemättömiä galaktolipidejä ja ^{3}H-DGDG:tä dispergoitiin 2,0 % (p/p) olevaksi kokonaispitoisuudeksi glyserolin 2,5-prosenttiseen (p/p) vesiliuokseen. Liposomidispersiota tasapainotettiin 36 tuntia 4 °C:ssa. Sitten sitä käsiteltiin ultraäänellä mikrokärkikoettimen avulla 3 x 2 minuuttia, pulssin lepoaika oli 4 minuuttia, typen alla 0 °C:ssa.

Rottakokeet

Ravinnotta pidetyt Sprague Dawley-rotat, jotka painoivat noin 250 g, nukutettiin dietyylieetterillä. Ulkoiseen kaulalaskimoon injektoitiin 0,5 ml tätä sonikoitua dispersiota, jonka radioaktiivisuus oli 1,8-2,7 μCi. Eläimet tapettiin puhkaisemalla aortta 2 minuutin; 15 minuutin; 60 minuutin; 4 tunnin ja 20 tunnin kuluttua. Maksa- ja veriplasmanäytteissä läsnäolevat lipidit uutettiin kloroformi:metanoli-seoksella 1:1 (til./-til.). Uutteet kuivattiin typellä, ne liuotettiin uudestaan kloroformiin ja analysoitiin ohutkerroskromatografisesti silikageeli 60-levyillä, jotka kehitettiin kloroformi:metanoli:vesi:etikkahappo-seoksessa 65:25:4:4 (til./til.). DGDG-täplä raavittiin laskuripulloihin; 1 ml metanoli-vesi-seosta 1:1 (til./til.) lisättiin ja seosta pyörresekoitettiin ennenkuin lisättiin 10 ml tolueeni:Instagel (Packard Instruments B.V., Alankomaat) -seosta 1:1 (til./til.). Radioaktiivisuus määritettiin Packard TriCarb-merkkisellä nestetuikelaskurilla. Tulokset on esitetty muodossa % injektoidusta ^{3}H-DGDG-annoksesta 10 ml:ssa veriplasmaa (4 % ruumiin kokonaispainosta) ja kokomaksaa eri ajanhetkillä, ja tulokset on koottu alla olevaan taulukkoon.

Taulukko 6

Injektoidusta ^{3}H-DGDG:stä 10 ml:aan veriplasmaa (4 % ruumiin kokonaispainosta) ja maksaa jäljelle jäänyt määrä eri ajanhetkillä, prosentteina. Tulokset on esitetty muodossa keskiarvo ± standardipoikkeama (n = 3).

	2 min	15 min	60 min	4h	24h
Plasma	57,8 ± 9,0	47,7 ± 5,4	17,4 ± 1,9	2,0 ± 0,4	0,04 ± 0,04
Maksa	9,9 ± 2,2	17,2 ± 2,2	13,0 ± 1,6	2,1 ± 0,5	0,16 ± 0,03

Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että DGDG:tä käsittävien vesikkelien puoliintumisaika on noin 30 minuuttia rottiin laskimon sisäisesti injektoituina. Edelleen, ilmeistä on se, että pääasiassa maksa hävittää galaktolipidivesikkelit verenkierrosta ja hajoattaa ne tehokkaasti.

Koe 3

Paikallisesti vaikuttavaa anestesialääkettä sisältävät valmisteet ja selkäydinanestesian in vivo-tutkimukset rotissa

Bupivakaiini-hydrokloridia, joka on paikallinen anestesialääke, sisältäviä erilaisia valmisteita valmistettiin seuravasti.

Aineosa	Koostumus A, %	Koostumus B, %	Koostumus C, %
Bupivakaiini·HCl	1,00	0,50	-
Galaktolipidit	10,00	-	10,00
Glyseroli, 99 %	2,57	2,48	2,59
Vesi	86,47	97,02	87,41

Valmisteiden kyky pidentää paikallisen anestesialääkkeen vaikutusta selkäytimeen ja hermojuuriin selvitettiin hallitussa kokeessa rottien avulla, joilla rotilla oli henkitorven sisään istutettu pitkäaikainen katetri.

Neljää urospuolisten Sprague-Dawley-rottien (paino: 235-300 g) ryhmää tutkittiin yhden viikon kuluttua siitä, kun eläinten

henkitorveen oli istutettu katetri menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa T.L. Yaksh ja T.A. Rudy, Physiol. Behav., 1976, vol. 17, sivut 1031-1036). Kahdelle rottaryhmälle annettiin erilaisia annoksia bupivakaiinia galaktolipidivalmisteessa (koostumus A), kolmannelle ryhmälle annettiin bupivakaiinia vesiliuoksena (koostumus B) ja neljännelle ryhmälle annettiin galaktolipidivalmistetta ilman paikallista anestesialääkettä (koostumus C) alla olevan taulukon mukaisesti:

Ryhmä	Rottien lkm.	Koostumus	Injektoitu tilavuus, µl	Bupivakaiinin injektoitu määrä, µg
Suuri annos	7	A	20	200
Pieni annos	7	A	10	100
Vertailu	8	B	20	100
Lume	6	C	20	0

Rotat jaettiin sattumanvaraisesti neljäksi ryhmäksi. Testattavaa ainetta annettiin istutetun katetrin avulla selkäytimen kovakalvotupen alempaan lantioalueeseen. Testattavan aineen vaikutus liikkumiseen arvioitiin säännöllisin väliajoin arvosanoilla 0, 1, 2, 3 ja 4, missä 0 = ei motorista häiriötä ja 4 = kummankin takaraajan ja eturaajan halvaantuminen. Rottia seurattiin vähintään 90 minuuttia.

Tulokset on koottu kuvioon 2. Kaikissa eläimissä, joille annettiin aktiivista paikallista anestesia-ainetta, todettiin motorisen toimintakyvyn selvä häiriintyminen nopeasti antamisen jälkeen. Tämän vaikutuksen kesto oli kuitenkin selvästi erilainen näissä kolmessa ryhmässä, liikuntakyvyttömyyden keston ollessa pisin suuren annoksen saaneessa ryhmässä ja lyhin vertailuryhmässä. Kaikki eläimet toipuivat täydellisesti 90 minuutissa. Erot olivat tilastollisesti merkittäviä suuren annoksen saaneessa ryhmässä ja pienen annoksen saaneessa ryhmässä vertailuryhmään verrattuna 20 minuutin kuluttua (Wilcoxon:in järjestystesti; Wilcoxon's signed rank test). Suuren annoksen saanut ryhmä oli myös erilainen kuin vertailuryhmä 30 minuutin

kuluttua. Lumeryhmässä ei todettu mitään vaikutusta millään ajanhetkellä. Odottamattomia tai toksisia vaikutuksia ei todettu ja kaikki vaikutukset olivat palautuvia.

Johtopäätös: Bupivakaiinia sisältävä galaktolipidivalmiste kykeni pidentämään merkittävällä tavalla bupivakaiinilla olevaa hermoa salpaavaa vaikutusta rottakokeessa, jossa rotilla oli henkitorven sisään istutettu pitkäaikainen katetri. Tämä osoittaa edelleen, että galaktolipidivalmisteen avulla voidaan pidentää bioaktiivisten komponenttien välisiä vuorovaikutuksia.

Koe 4

Li-GLA:ta sisältävien liposomien in vitro-hemolyysikoe

Esimerkissä 25 valmistetun liposomaalisen Li-GLA-valmisteen hemolyyttinen vaikutus testattiin ja verrattiin vapaaseen Li-GLA:han käyttäen ihmisen kokoverta seuraavalla tavalla menettelemällä.

Ihmisverta kerättiin terveistä vapaaehtoisista 10 ml:n Vacutainer-putkiin (Becton Dickinson, Kanada), jotka sisälsivät 143 USP-yksikköä natriumhepariinia. 2 ml:n suuruiset verinäytteet siirrettiin 25 ml:n Erlenmeyer-pulloihin ja jokaiseen sekoitettiin 1,0 ml testattavaa valmistetta, joka oli laimennettu 0,9 % suolaliuoksella kokeessa tarvittavaan pitoisuuteen pääsemiseksi. Sitten näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa happi:hiilidioksidi-seoksessa, 95:5, rikastetussa ilmakehässä, 3 l/min 1 tunnin ajan samalla koko ajan varovasti sekoittaen. Inkuboinnin päätyttyä 10 µl veriseosta siirrettiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkessa olevaan 500 µl:aan suolaliuosta. 100-prosenttiseen hemolyysiin johtavat standardit valmistettiin lisäämällä 10 µl verta 1,5 ml:n Eppendorf-putkessa olevaan 500 µl:aan puhdasta vettä. Sitten kaikkia näytteitä lingottiin 2 minuuttia Eppendorf Microfuge-sentrifugilla (Brinkman Instruments Ltd, Kanada) ja lopuksi ne analysoitiin sentrifugianalysaattorilla (Cobas Bioanalyser; Hoffmann-La Roche Ltd., Kana-

da) käyttäen UV-skannausta aallonpituudella 540 nm. Tulokset esitetään seuraavassa.

Li-GLA-pitoisuus, mM	Hemolyysi, %
1,0	0,8
5,0	1,1
10,0	2,8
12,0	6,9
15,0	21,9
17,5	38,8

0,9-prosenttiseen suolaliuokseen liuotettu Li-GLA aiheuttaa 100-prosenttisen hemolyysin noin 4-5 mM:n pitoisuutena. Täten Li-GLA:n hemolyyyttinen aktiivisuus vähenee huomattavasti liposomaalisessa muodossa. Liposomaalisen Li-GLA:n vähentynyt hemolyyttinen aktiivisuus on varmistettu rotissa toteutetuissa alustavissa in vivo-tutkimuksissa; hemolyysi vähenee 50-80 % käytettäessä liposomaalista valmistetta vapaan Li-GLA:n sijasta. Liposomivalmiste ei aiheuta rotissa "punaista virtsaa", kun taas Li-GLA aiheuttaa. Lisäksi on todettu, että in vitro-aktiivisuus syöpäsoluja vastaan on lähes samanlaista sekä vapaalla Li-GLA:lla ja liposomaalisella Li-GLA:lla. Näiden kokeiden perusteella voidaan päätellä, että liposomaalinen galaktolipidi vähentää tämän lääkeaineen aiheuttamaa hemolyysiä, joka on sen vakava sivuvaikutus, lääkeaineen farmakologiseen vaikutustehoon vaikuttamatta.

Johtopäätös

Olemme tehneet tähän keksintöön liittyen sen johtopäätöksen, että keksinnön mukaiseen galaktolipidimateriaaliin perustuvat, lipidipolaarisesta liuottimesta muodostetut valmisteet ovat joka suhteessa parempia kuin fosfolipidivalmisteet, ajatellen esimerkiksi valmisteiden fysikaalista stabiilisuutta, lääkeaineiden sisällyttämisen tehokkuutta sekä valmisteen kykyä vapauttaa hitaasti niihin sisällytettyjä lääkeaineita.

Patenttivaatimukset

1. Lipidipolaarisesta liuottimesta muodostuvan kaksikerroksisen valmisteen käyttö aktiivisen aineen kantajana farmaseuttisessa, kosmeettisessa tai elintarviketuotteessa, t u n n e t t u siitä, että tämä valmiste koostuu 0,01-90 paino-%:sta, edullisesti 0,1-50 %:sta kaksikerroksen muodostavaa ainetta polaarisessa liuottimessa, tämän kaksikerroksen muodostavan aineen ollessa viljakasvista saatua galaktolipidimateriaalia, joka koostuu vähintään 50-prosenttisesti digalaktosyylidiasyyliglyseroleista, lopun ollessa muita polaarisia lipidejä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen valmisteen käyttö, t u n n e t t u siitä, että galaktolipidimateriaali koostuu noin 70-80 %:sta digalaktosyylidiasyyliglyseroleja ja 20-30 %:sta muita polaarisia lipidejä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen valmisteen käyttö, t u n n e t t u siitä, että galaktolipidimateriaali koostuu korkeintaan 100 %:sta digalaktosyylidiasyyliglyseroleja.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisen valmisteen käyttö, t u n n e t t u siitä, että valmiste käsittää 25-90 paino-% galaktolipidimateriaalia polaarisessa liuottimessa.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisen liposomivalmisteen käyttö, t u n n e t t u siitä, että valmiste käsittää 0,01-25 paino-% galaktolipidimateriaalia polaarisessa liuottimessa.

6. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lipidistä ja polaarisesta liuottimesta muodostuvaa kaksikerroksista valmistetta, joka koostuu 0,01-90 paino-%:sta, edullisesti 0,1-50 %:sta kaksikerroksen muodostavaa ainetta polaarisessa liuottimessa, tämän kaksikerroksen muodostavan aineen ollessa viljakasvista saatua galaktolipidi-

materiaalia, joka koostuu vähintään 50-prosenttisesti digalaktosyylidiasyyliglyseroleista, lopun ollessa muita polaarisia lipidejä, seoksena terapeuttisesti aktiivisen aineen kanssa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että galaktolipidimateriaali koostuu noin 70-80 %:sta digalaktosyylidiasyyliglyseroleja ja 20-30 %:sta muita polaarisia lipidejä.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että galaktolipidimateriaali koostuu korkeintaan 100 %:sta digalaktosyylidiasyyliglyseroleja.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 6-8 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää:
- terapeuttisesti aktiivista ainetta terapeuttisesti tehokkaana määränä;
- galaktolipidimateriaalia 1-50 paino-% koostumuksen kokonaispainosta;
- polaarista liuotinta; ja
- isotoniseksi tekevää ainetta isotonisesti tehokkaana määränä.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 6-9 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että sitä annetaan suun tai suolen kautta, ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti, peräsuolen tai emättimen kautta, paikallisesti, silmän, nenän tai korvan kautta.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 6-9 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että terapeuttisesti aktiivinen aine on gamma-linoleenihapon suola tai esteri ja että galaktolipidimateriaalin määrä on vähemmän kuin 25 % koostumuksen kokonaispainosta.

12. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 6-9 mukaisen farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 0,01-25 paino-% galaktolipidimateriaalia sekoitetaan aktiiviseen aineeseen ja polaariseen liuottimeen, jonka määrä on jopa 100 paino-%.

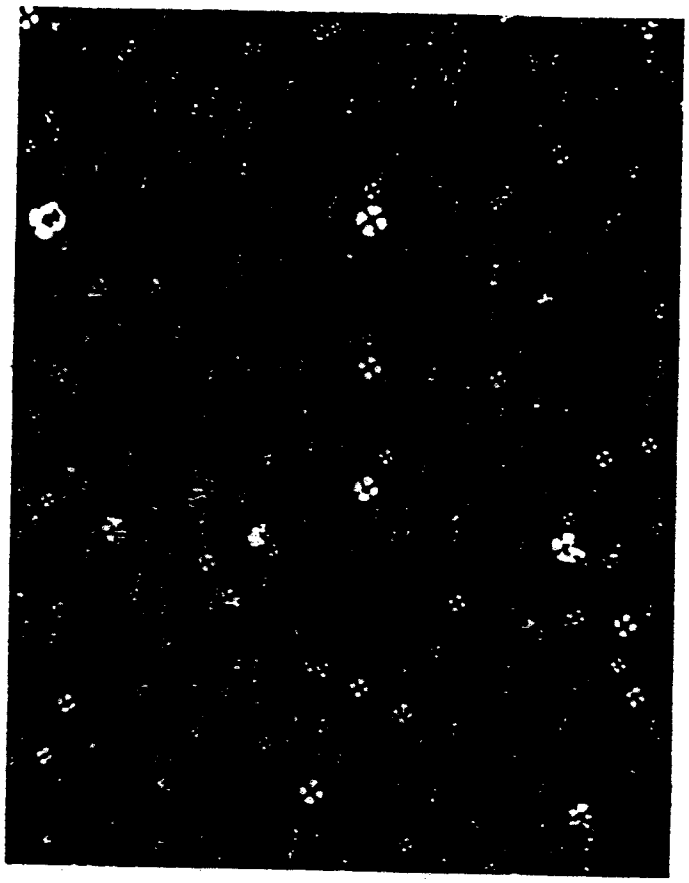
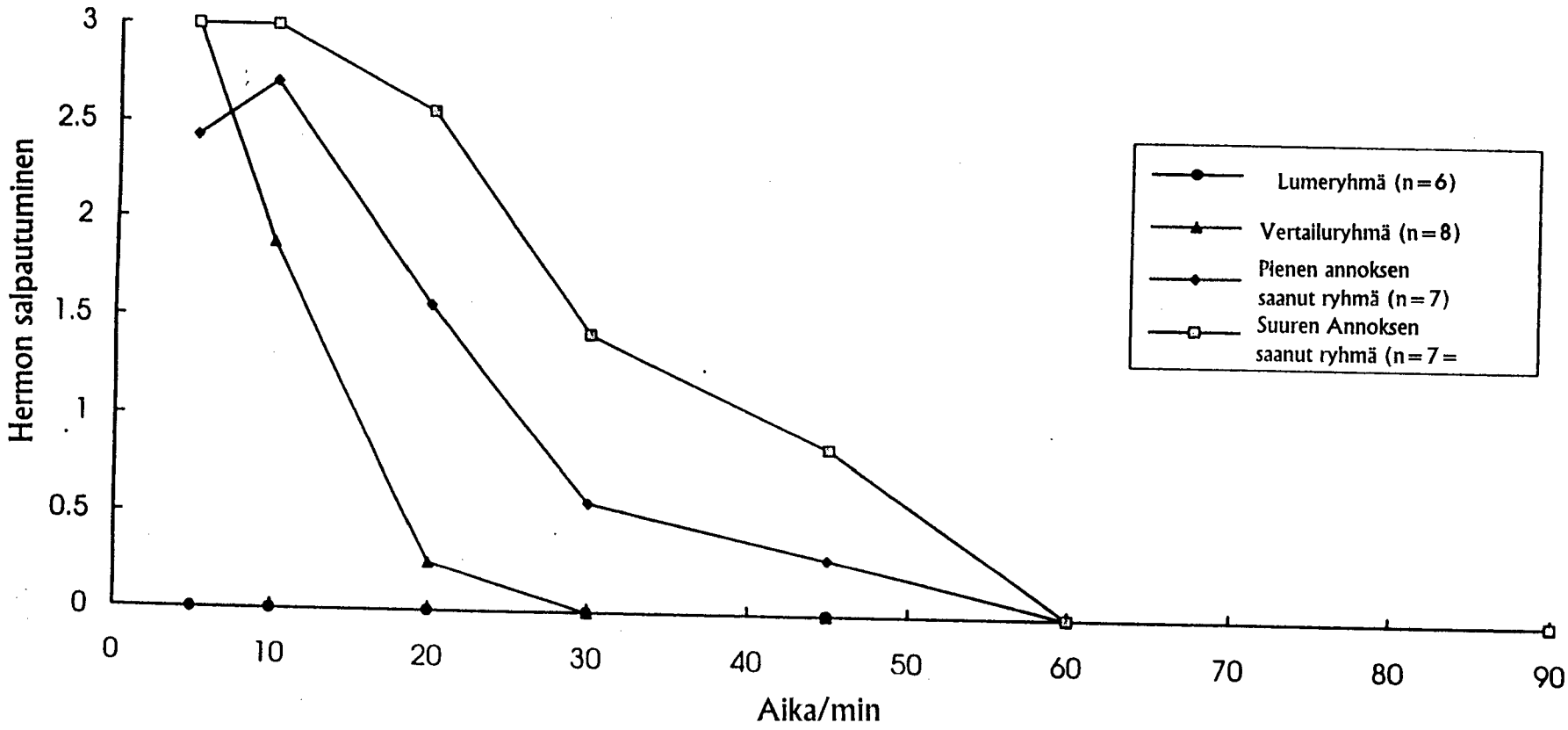


FIG 1

FIG 2


Hermon salpautuminen
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Aika/min
Lumeryhmä (n=6)
Vertailuryhmä (n=8)
Pienen annoksen saanut ryhmä (n=7)
Suuren Annoksen saanut ryhmä (n=7=