ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 1470-96

(13) A3

6(51) A 61 K 9/127

(22) 28.09.95

(32) 30.09.94

(31) 94/94810570

(33) EP

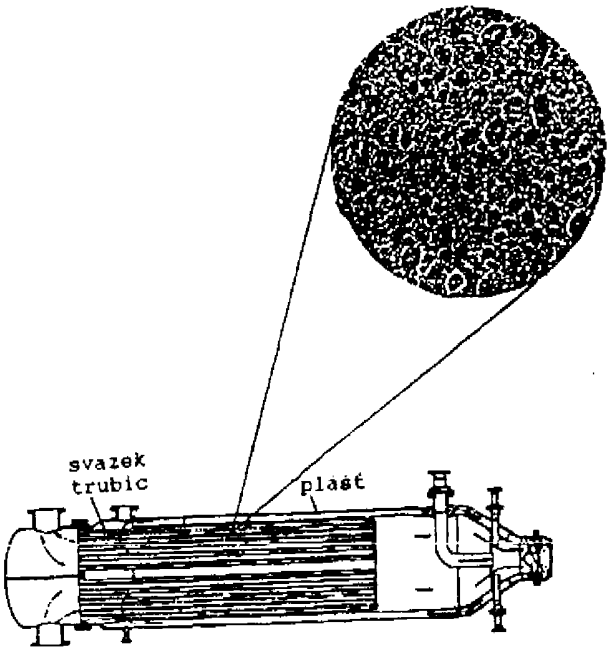
(40) 14.08.96

(71) BRACCO RESEARCH S. A., Carouge, CH;

(72) Tournier Hervé, Valleiry, FR;
Schneider Michel, Troinex, CH;
Guillot Christian, Le Chable-Beaumont, FR;

(54) Liposomy se zvýšenou zachycovací kapacitou, způsob jejich přípravy a jejich použití

(57) Tento vynález se týká suchého povlaku jako prekurzoru liposomových vezikul, kde prekurzor je trojrozměrná expandovaná struktura se sypnou hmotností od 0,01 do 0,001 g/cm^3. Vynález se také týká způsobu přípravy liposomových vezikul se zvýšenou zachycovací kapacitou rozpuštěním alespoň jednoho filmu vytvářejícího lipidy v alespoň jednom organickém rozpouštědle za vzniku roztoku v reakční nádobě, odpařením rozpouštědla za vzniku trojrozměrné expandované porézní lipidové struktury, stykem lipidového povlaku s vodnou fází jako nosičovou látkou, a přípravou liposomových vezikul zachycujících fázi nosné látky, stejně jako zařízení zahrnující seskupení z trubic nebo inertní náplně, které slouží jako materiál nosné látky nebo jako povrchová základní hmota pro povlékání lipidů připravovaných podle tohoto způsobu.



ČJ. 37124
DOŠLO 21 V 96
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

1470-96

Liposomy se zvýšenou zachycovací kapacitou, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

Tento vynález se týká prekurzoru liposomových vezikul ve formě suchého lipidového povlaku a způsobu přípravy liposomových vezikul se zvýšenou zachycovací kapacitou rozpuštěním alespoň jednoho filmu vytvářejícího lipidy v alespoň jednom organickém rozpouštědle v reakční nádobě, povlékáním lipidy odpařením rozpouštědla, stykem lipidového povlaku s vodným roztokem jako nosičovou fází, a přípravou roztoku zachycujícího liposomové vezikuly. Vynález se také týká zařízení pro provádění tohoto způsobu, kontrastních činidel obsahujících prekurzor liposomových vezikul a způsobu přípravy kontrastních činidel za použití prekurzoru.

Dosavadní stav techniky

O liposomových vezikulách, jejichž vázací obal sestává z dvou nebo většího počtu vrstev lipidových molekul, jsou dlouho známy jako systémy uvolňující léčivou látku, které mohou zlepšit terapeutickou a diagnostickou účinnost mnoha léčivých látek a kontrastních činidel. Experimenty s řadou rozdílných antibiotik a kontrastních činidel pro rentgenové záření ukázaly, že lepší terapeutická účinnost a lepší kontrast s vyšší úrovní bezpečnosti se mohou dosáhnout enkapsulací léčivých látek a kontrastních činidel s liposomy. Velký zájem o liposomy jako enkapsulační systémy pro léčivé látky ukázal, že úspěšný vývoj takových produktů a jejich zavedení do výroby vyžaduje reprodukovatelné metody pro výrobu liposomových vezikul s vhodnými charakteristickými

vlastnostmi ve velkém měřítku. Proto se začaly hledat metody, které budou v souladu s produkcí liposomových vezikul v požadovaném měřítku a koncentraci, distribucí velikosti a zachycovací kapacitou bez ohledu na povahu původní lipidové směsi. Takové metody mají poskytnout liposomy se souhlasným poměrem aktivní látky k lipidu, zatímco dodržují současně přijímanou dobrou výrobní praxi. Jako výsledek takového hledání a v důsledku skutečnosti, že chování liposomů se může podstatěně měnit se změnou výrobních parametrů, byly navrženy mnohé tak dalece odlišné způsoby přípravy.

Obvyklé způsoby přípravy liposomů zahrnují řadu stupňů, ve kterých se složky vytvářející buď větší počet nebo dvě vrstvy (fosfolipidy nebo směsi fosfolipidů s jinými lipidy, například cholesterolem) rozpouštějí v těkavém organickém rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel v baňce s kulatým dnem, s následujícím odpařením rozpouštědla za podmínek (teplota a tlak), které zabrání oddělení fází. Po odstranění rozpouštědla se suchá směs lipidů, obvykle ve formě filmu povlečeného na stěnách reaktoru, hydratuje vodným prostředím, které může obsahovat rozpuštěné pufry, soli, kondicionační činidla a aktivní látku určenou k zachycení. Liposomy se budou tvořit v hydratačním stupni, přičemž část vodného prostředí začne být zachycena v liposomech. Hydratace se může provádět s nebo bez dodání energie roztoku, pomocí míchání, působení ultrazvuku nebo mikrofluidizace, s následující extrudací přes jeden nebo větší počet polykarbonátových filtrů. Volná neenkapsulovaná aktivní látka se může oddělit, aby se získala, a produkt se filtruje, sterilizuje, popřípadě lyofilizuje a balí.

Hydratace více než jakýkoli jiný stupeň ovlivňuje typ vzniklých liposomů (velikost, počet lipidových vrstev a

zachycený objem). Povaha suchého lipidu, jeho plocha povrchu, a jeho porozita jsou zvláště důležité. Tak bylo zjištěno, že hydratační a zachycovací proces jsou nejúčinnější, když film vysušených lipidů se udržuje tenký. To znamená, že čím větší je množství lipidu, tím se vyžaduje větší povrch pro povlékání lipidy, co také znamená, že se rovněž používají skleněné kuličky nebo jiné inertní nerozpustné částice ke zvýšení povrchové plochy pro ukládání filmu. Metoda tenkého filmu zůstává způsobem pro přípravu ve velkém i v laboratorním měřítku.

Jiné metody pro přípravu liposomů zahrnující injekční zavádění organických roztoků lipidů do vodného prostředí s nepřetržitým odstraňováním rozpouštědla, za použití rozstřikovacího sušení, lyofilizace, mikroemulsifikace, mikrofluidizace a podobně, jsou navrženy v řadě publikací nebo patentů, jako například v US-A-4 529 561, v US-A-4 572 425 a podobně.

Pokus vyřešit problémy s produkcí liposomů ve větším měřítku je popsán v US-A-4 935 171 (Vestar). Zde je uveden způsob přípravy liposomů v průmyslovém množství, spočívající v přípravě homogenního a rovnoměrného lipidního filmu v odparce s tenkým filmem, který se dosahuje odpařováním organického rozpouštědla. Po odpaření tenkého filmu lipidů, který se vytvořil na vnitřní stěně odparky, se povlak hydratuje in situ vodnou fází za míchání, dosahovaného rotorem. I když roztok navržený v tomto dokumentu se zdá být stupněm ve správném směru, poměr povrchu lipidového filmu k objemu reaktoru je pouze slabě lepší, pokud není vůbec nepostačující, než u baňky s kulatým dnem, používané v laboratorním měřítku. Výtěžek v reakčním prostoru a čase neboli produktivita je stále příliš nízká proto, aby proces

byl ekonomicky přiměřený a konkurence schopný.

Úsilí bylo zaměřeno na různé aspekty průmyslové přípravy liposomů a byla navržena řada zlepšení a rozdílných řešení problému, jak zvětšit výrobní měřítko. Dokumenty, jako je například WO-A-86/00238, WO-A-87/00043, US-A-4 737 323, US-A-4 753 788 a US-A-4 781 871 navrhují použití rychlého vymražování z předem připravených vícevrstvých vezikul s následujícím zpracováním vymražením a roztátím, ke zlepšení jejich zachycovací kapacity, za použití extrudační techniky z multilamelárních liposomů, ke zlepšení jejich distribuce velikosti a podobně.

Dosud nebyla doporučena průmyslová metoda ve velkém měřítku, u které by řízení výrobních parametrů dovolovalo reprodukovatelný proces, při kterém by se zpracovávaly velké objemy kapaliny v relativně malém prostoru reaktoru. Všechny známé způsoby v poloprovozním (pilotním) nebo průmyslovém měřítku budou obvykle vázány na malé násady, ve kterých by zpracování velkých objemů zředěných roztoků liposomů vyžadovalo řadu pater a velký reakční prostor, stejně jako manipulaci s velkými objemy roztoků a rozpouštědel. Ve skutečnosti v důsledku relativně malých výtěžků v prostoru a čase neboli nízké produktivity reaktoru jsou tyto metody příliš nepohodlné a potud příliš nákladné pro výrobu v průmyslovém měřítku.

Podstata vynálezu

Krátce shrnuto, tento vynález se týká prekurzorů liposomových vezikul na nosiči nebo bez nosiče ve formě trojrozměrné struktury expandovaných liposomů se sypnou hmotností pod 0,1 g/cm^3, výhodně pod 0,08 g/cm^3, výhodněji

mezi 0,05 a 0,001 g/cm^3 a obzvláště výhodně od 0,02 do 0,01 g/cm^3. Výrazem struktura na nosiči se rozumí, že porézní povlak lipidů je vytvořen na seskupení nebo síti z inertního nosného materiálu. Lipidy vytvářející povlak jsou zvoleny ze syntetických nebo přírodních, nasycených nebo nenasycených fosfolipidů včetně kyseliny fosfatidové, fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidylinositolu a jejich směsí. Lipidy mohou dále obsahovat látky zvolené z dicetylfosfátu, cholersterolu, ergosterolu, fytosterolu, sitosterolu, lanosterolu, α-tokoferolu, kyseliny stearové, stearylaminu a jejich směsí.

Tento vynález se také týká způsobu přípravy liposomových vezikul se zvýšenou zachycovací kapacitou, který spočívá v tom, že se rozpustí alespoň jeden lipid vytvářející film v přinejmenším jednom organickém rozpouštědle za vzniku roztoku. Roztok lipidů se zavede do vhodné reakční nádoby a podrobí odpaření, přičemž vysušené lipidy vytvoří expandovanou trojrozmérnou porézní strukturu, jejíž sypná hmotnost je pod 0,1 g/cm^3, výhodně pod 0,08 g/cm^3, výhodněji mezi 0,05 a 0,001 g/cm^3 a obzvláště výhodně od 0,02 do 0,01 g/cm^3. Potom se porézní struktura uvede do styku s vodnou fází nosné látky, aby se připravily liposomové vezikuly zachycující část nosičové fáze.

Vynález dále zahrnuje zařízení pro přípravu liposomů se zvýšenou zachycovací kapacitou podle výše uvedeného způsobu, které obsahuje reakční nádobu s přívodem a odvodem, přívod vakua, přípravek pro chlazení a zahřívání, kontrolní přístroje a náplň zahrnující seskupení těsně uspořádaných trubic plněných inertním materiálem. Výhodně jde o trubice z nerezavějící ocele s vnitřním průměrem od 0,5 do 5 mm a tloušťkou stěny mezi 0,5 a 2 mm. Při jiném provedení náplň,

která může být ve stacionárním stavu nebo pohybující se, například fluidizována, může obsahovat Raschigovy kroužky, duté skleněné kuličky, retikulovaný uhlík, retikulovaný sklovitý uhlík, retikulovaný kov, skleněnou nebo kovovou vlnu a skleněná nebo kovová vlákna.

Trojrozměrné lipidové struktury podle tohoto vynálezu jsou velmi vhodné pro přípravu liposomů s vysokou zachycovací kapacitou, prováděnou ve velkém měřítku.

Pokud se provádí inkubace s vodnou fází nosné látky obsahující kontrastní prostředí, trojrozměrné lipidové struktury podle tohoto vynálezu jsou zvláště vhodné pro přípravu diagnostických kontrastních činidel.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 je blokový diagram reaktoru s průřezem ukazujícím expandovanou trojrozměrnou lipidovou strukturu podle tohoto vynálezu.

Obr. 2 znázorňuje blokový diagram reaktoru se seskupením vnitřních trubic.

Na obr. 3 je vyneseno povlékání lipidem proti koncentraci.

Na obr. 4 je vyneseno povlékání lipidem proti lineární rychlosti.

Obr. 5 znázorňuje blokové schéma produkce kontrastního prostředí za použití expandovaných lipidových struktur podle tohoto vynálezu.

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález je založen na nečekaném zjištění, že optimální liposomová formace a zvýšená kapacita reaktoru se dostanou, pokud během přípravy vezikul, povlak lipidu získaný odpařením rozpouštědla z organického roztoku alespoň jednoho lipidového filmu v alespoň jednom organickém rozpouštědle, předtím než se uvede do styku s vodou fází nosné látky, se expanduje do trojrozměrné struktury, jejíž sypná hmotnost je pod 0,1 g/cm^3, výhodně pod 0,08 g/cm^3, výhodněji mezi 0,05 a 0,001 g/cm^3 a obzvláště výhodné od 0,02 do 0,01 g/cm^3. I když přesné příčiny takových nečekaných výsledků nejsou pečlivě zjištěny, předpokládá se, že způsob poskytuje přijatelně veliký poměr povrchu povlaku k jeho objemu, a proto následující hydratace povrchu je účinnější. Vysoké výtěžky liposomů o požadované velikosti a distribuci se tak dosahují způsobem, který je obzvláště snadný pro produkci ve velkém měřítku a k jejímu řízení. Expandované lipidové struktury, které mají veliký poměr povrchu k objemu, zlepšují výtěžek reaktorů v prostoru a čase, přičemž technický postup se stává průmyslově velmi přitažlivý. Kromě toho pro snadnější dosažení většího měřítka a napomáhání vysoké produktivitě, způsob poskytuje další výhody, které zahrnují rychlejší cykly reaktoru v čase, snadné řízení hydratačního stupně, snížení doby zpracování, používání nenákladných materiálů a konečně používání stejného reaktoru pro povlékání, odpařování rozpouštědla, hydrataci expandované lipidové struktury a sterilizaci vytvořených liposomových vezikul.

Bylo nalezeno, že porézní struktury čistých lipidů podle tohoto vynálezu mají velmi velký poměr povrchu

k objemu. Naneštěstí v důsledku vysoké křehkosti expandované struktry přesná plocha povrchu na objemovou nebo hmotnostní jednotku expandované lipidové struktury se nemůže stanovit s vysokou přesností. Avšak opatrné stanovení celkové plochy povrchu z 1 g expandované struktry podle tohoto vynálezu naznačuje, že celková plocha povrchu se může měnit od 0,1 do 50 m^2, co znamená, že poměr povrchu k objemu je mezi 10 a $0,5 \times 10^5$.

Expandovaná trojrozměrná lipidová struktura se může dosáhnout odpařením organického rozpouštědla z reakční nádoby, která obsahuje inertní porézní síť nebo nosnou látku, která slouží jako materiál nosné látky nebo jako povrchová základní hmota pro povlékání lipidů. Inertní sítí může být jakýkoli obvyklý materiál, s relativně velkým poměrem povrchu k objemu a může zahrnovat seskupení trubic nebo seskupení z inertní náplně, jako jsou duté skleněné kuličky, retikulovaný uhlík, retikulovaný sklovitý uhlík, retikulovaný kov, skleněná, keramická nebo kovová vlna a skleněná, keramická nebo kovová vlákna. Pokud se použije seskupení trubic, rozměry trubic by se měly volit tak, aby se dosáhl maximální poměr povrchu k objemu. Experimenty prováděné v průběhu vývoje a charakterizace reaktoru podle tohoto vynálezu ukazují, že daná konfigurace trubic s vnitřním průměrem od 0,5 do 5 mm a tloušťkou stěny od 0,5 do 2 m poskytuje příznivé výsledky, avšak jiná uspořádání reaktoru mohou uspokojit při jiných rozměrech trubic. Bylo nalezeno, že protože určitý lipidový roztok pokrývá vnitřní a vnější povrch trubice působením gravitace, seskupení vertikálně uspořádaných trubic je výhodné, třebaže šroubovicové uspořádání je také možné.

Za účelem usnadnění rovnoměrného povlékání lipidových

filmů může být inertní náplň jemně fluidizována nebo reaktor může být naplněn Raschigovými kroužky nebo jiným inertním materiálem, jako je uveden výše, který se může dávkovat s lipidovým roztokem ze shora a nechat opatrně stékat dolů po náplni. Předpokládá se, že vynikající výsledky se dosáhnout ve skrápěné věži, přičemž uspořádání vychází ze skutečnosti, že účinná kontrola tloušťky povlaku se dosahuje uspořádáním využívajícím skrápění, při styku lipidového roztoku a nosné látky. Přebytek kapaliny se konstantně odstraňuje, čímž se zajistí rovnoměrná tloušťka kapaliny na celém povrchu nosné látky. K dalšímu napomáhání rovnoměrné tvorbě povlaku z lipidového roztoku na náplni se může protisměrným způsobem během časového období zavádět inertní plyn, jako je dusík. Plyn je obvykle ochlazen, avšak za určitých podmínek může být žádoucí, aby se teplota plynu zvolila tak, že napomáhá sušení a expanzi lipidového filmu nebo je dovoleno použití horkého plynu.

Po vysušení a expanzi povlaku, který sestává z vyčištěných lipidů nebo lipidů s běžným stupněm čistoty, do trojrozměrné struktury se povlak uvede do styku s vodnou fází nosné látky. V závislosti na uspořádání reaktoru se nosná fáze může zavádět na nižší konec reaktoru, například v případě uspořádání skrápěné věže nebo fluidizovaného lóže nebo na hlavu reaktorové kolony (v případě pevného seskupení trubic). Používaná vodná nosná fáze může být čistá nebo může obsahovat biologicky aktivní látky, kontrastní činidla nebo obě tyto látky. Ve skutečnosti se libovolná biologicky aktivní látka může zachycovat v liposomech připravených podle tohoto vynálezu. Mezi takové látky se zahrnují antibakteriálně účinné sloučeniny, jako je gentamycin, antivirově účinné sloučeniny, jako je rifamycin, antifungálně účinné sloučeniny, jako je amfotericin B, protiparazitícky účinné

sloučeniny, jako jsou deriváty antimonu, antineoplasticky účinné sloučeniny, jako je mitomycin C, doxorubicin a cis--platina, proteiny, jako je albumin a lipoproteiny, imunoglobuliny, toxiny, jako je diphteria toxin, enzymy, jako je katalasa, hormony, neurotransmitory, radioopaktní sloučeniny, jako je ^{99}Tc, fluorescenční sloučeniny, jako je karboxyfluorescein, protizánětlivé sloučeniny, jako je kyselina salicylová a ibuprofen, anestetika, jako je dibukain nebo lidokain a podobné.

Velmi dobré výsledky a vysoké zachycovací zatížení se dosahují s jodovanými rentgenovými kontrastními činidly, jako je iopamidol, iomeprol, iohexol, iopentol, iotrolan, iodixanol, ioglukol a podobné. Poměr jodu k lipidu u liposomových vezikul podle tohoto vynálezu je alespoň 2,75.

Odpařování organického rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel se provádí nad teplotou místnosti nebo při sníženém tlakem nebo při obou těchto parametrech. Experimenty ukazují, že rychlost odpařování je silně ovlivněna stupněm expanze lipidové struktury. Proto pro optimální expanzi je přiměřené řídit množství tepla a tlak v reaktoru. Řízení se stává zvláště důležité na konci odpařování rozpouštědla, to znamená, když roztok houstne a stává se viskózní. V tomto okamžiku slabé snížení tlaku bude mít za výsledek relativně rychlou expanzi (pénění). Bylo zjištěno, že vyrovnáním teploty a tlaku pro dané rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel se mohou dosáhnout rozdílného stupně expanze lipidového povlaku. Nejlepší výsledky se získají, pokud se organické rozpouštědlo vybere z petroletheru, chloroformu, methanolu, ethanolu, propanolu, isopropanolu, n-butanolu, terc.-butanolu, pentanolu, hexanolu, pentanu, hexanu, heptanu, cyklohexa-

nu a jejich směsi. Výhodné je rozpouštědlem azeotropická směs dvou rozpouštědel. Dobré výsledky se dosahují s azeotropickou směsí ethanolu s cyklohexanem, chloroformu s methanolem a isopropanolu s hexanem.

Lipidy používané pro přípravu liposomových vezikul jsou běžné látky a jsou zvoleny ze syntetických nebo přírodních, nasycených a/nebo nenasycených fosfolipidů včetně fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidylinositolu a kyseliny fosfatidové. Obzvláště vhodné jsou tyto fosfolipidy: dipalmitoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylglycerol, kyselina dipalmitoylfosfatidová, dipalmitoylfosfatidylethanolamin a odpovídající distearoylové a dimyristylové protějšky a jejich směsi. Tyto lipidy nebo jejich směsi mohou dále obsahovat látky zvolené z dicetylfosfátu, cholersterolu, ergosterolu, fytosterolu, sitosterolu, lanosterolu, α-tokoferolu, kyseliny stearové, stearylaminu a jejich směsí.

Tento vynález také zahrnuje trojrozměrnou strukturu expandovaných suchých lipidů na nosné látce nebo bez nosné látky o sypné hmotnosti pod 0,1 g/cm^3, výhodně pod 0,08 g/cm^3, výhodněji mezi 0,05 a 0,01 g/cm^3. Strukturou na nosné látce se míní, že lipidový porézní povlak je vytvořen na seskupení z inerního nosného materiálu.

Expandované trojrozměrné lipidové struktury jsou mimořádně vhodné pro přípravu liposomů s vysokou zachycovací kapacitou, zvláště pokud tyto lipidy jsou používány k nesení léčivých látek nebo diagnostických kontrastních činidel. V takovém případě porézní trojrozměrná lipidová struktura se uvádí do styku s vodným roztokem, který obsahuje léčivou látku nebo diagnostický přípravek jako aktivní složku,

přičemž liposomy budou tvořit a enkapsulovat složku. Liposomy nesoucí aktivní látku se potom zpracovávají jak je přiměřené běžným způsobem. Při jiném provedení se může nejprve vytvořit suspenze "nezaplněných" liposomových vezikul, to znamená liposomových vezikul obsahujících toliko vodnou kapalnou nosnou látku. V následujícím stupni se tyto "nezaplněné" liposomy uvádějí do styku s roztokem, který obsahuje aktivní složku a vezikuly se naplní za použití například transmembránové techniky plnění.

Vynález dále zahrnuje zařízení pro přípravu liposomů s vysokou zachycovací kapacitou, zahrnující reakční nádobu s přívodem a odvodem, přívod vakua, přípravek pro chlazení a zahřívání, kontrolní přístroje a náplň, vyznačující se tím, že náplní je seskupení z těsně uspořádaných trubic z inertního materiálu. Trubice s vnitřním průměrem od 0,5 do 5 mm a tloušťkou stěny mezi 0,5 a 2 mm jsou výhodně uloženy ve vertikálním směru, třebaže uspořádání podobné spirále je také možné.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady dále ilustrují tento vynález.

Příklad 1

Charakterizace reaktoru

Vertikální, 1 metr vysoká kolona z nerezavějící oceli 316L, o vnitřním průměru 50 mm, opatřená termoregulací, uložená na svém spodním konci v kovovém roštu, se vyplní 12 trubicemi z nerezavějící oceli. Vnitřní průměr trubic je 4 mm a tloušťka stěn odpovídá 1 mm. Před umístěním trubic do

reaktoru se trubice bodově svaří za vzniku seskupení paralelních trubic. Připraví se stejné uspořádání reaktoru s tím rozdílem, že trubice mají průměr 2 a 3 mm, a toto uspořádání se také testuje.

Před testy zaměřenými na expanzi povlaků lipidů se charakterizace reaktoru provede povlékáním neexpandovanými lipidovými filmy, za použití lipidové kompozice tohoto složení: hydrogenovaný sojový lecithin a dicetylfosfát v molárním poměru 9:1. Experimenty se provádějí ke stanovení nejlepších podmínek pro získání povlaků lipidů v trubici a stanovení dopadu koncentrace lipidu, vnitřního průměru a povahy trubice a rychlosti odtoku lipidového roztoku. Ve všech případech lipidové roztoky v chloroformu se zavádějí do trubic za teploty místnosti a po naplnění trubic ode dna se lipidové roztoky odvádějí řízenou rychlostí. Povlak se vysuší za teploty 80 ^{o}C pod dusíkovou atmosférou odpařením rozpouštědla a suchý povlak se třikrát propláchne malým množstvím chloroformu.

Tabulka 1

Koncentrace lipidu	Povlak lipidů, mg lipidu na 100 cm^2	
g/l	trubice 3 mm	trubice 4 mm
180	33,1	23,3
220	43,7	29,7
260	62,5	40,0
300	81,5	56,5
320	94,5	80,4
340	111,3	84,2

Jak se ukazuje v tabulce 1 a na obr. 3, množství lipidů povlečených při různých koncentracích lipidů a dvou rozdílných průměrech trubice z nerezavějící oceli se zvyšuje se zvýšením koncentrace lipidů. Kromě toho větší tloušťka povlaku na jednotku plochy se dosahuje v trubici o průměru 3 mm než v trubici o průměru 4 mm. V obou případech se zdá, že množství uložených lipidů je v poměru k druhé mocnině koncentrace lipidů.

Jak může být zřejmé z tabulky 2, množství povlečených lipidů vzrůstá s rychlostí odtoku kapaliny. Pokud však tyto výsledky jsou vyjádřeny jako funkce rychlosti odtoku kapaliny (v cm za minutu) spíše než rychlosti odváděného toku (v ml za minutu), množství povlékaných lipidů se zdá být blízké poměru jejich lineární rychlosti a to nezávisle na skutečné velikosti trubice, viz obr. 4.

Tabulka 2

Rychlost odtoku	Povlak lipidů, mg lipidů/100 cm^2, v trubici o průměru		
ml/min	2 mm	3 mm	4 mm
1	55,2	55,3	37,4
2	76,5	63,0	47,3
3,75	114,9	83,7	65,4
5	121,0	94,5	80,4

Další experimenty se provádějí při identickém celkovém uspořádání s tím rozdílem, že se používají skleněné trubice na místo trubic z nerezavějící oceli. Ukazuje se, že nejsou žádné významnější rozdíly mezi oběma nosnými látkami s ohledem na povlékání lipidu. Homogenita lipidového povlaku se stanovuje při odříznutí povlečené ocelové trubice z horní části v rozmezí délky 10 cm a změřením tloušťky filmu. Dosažené výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Frakce	Povlak lipidů, mg	
	trubice 3 mm	trubice 4 mm
1	5,15	5,13
2	6,63	3,77
3	7,22	4,52
4	8,20	3,50
5	7,59	5,58
6	6,55	6,16
7	5,59	6,38
8	5,63	6,21
9	5,22	6,97
10	9,06	6,86
průměr ± směrodatná odchylka	6,68 ± 1,33	5,51 ± 1,24

Výpočet zřejmé (sypné) hmotnosti povlaků lipidů se dostane ze tří rozdílných uspořádání reaktoru, které ukazují, že pro trubici o průměru 2 mm je sypná hmotnost od 0,04 do 0,06 g/cm^3, pro trubici o průměru 3 mm je sypná hmotnost od 0,02 do 0,04 g/cm^3 a pro trubici o průměru 4 mm je sypná hmotnost od 0,01 do 0,03 g/cm^3.

Způsob přípravy liposomů

Po charakterizaci se zhotoví nový reaktor s 250 trubicemi z nerezavějící oceli a zapojí se do okruhu znázorněného na obr. 5. Do skleněného reaktoru 1 o objemu 1 litr, vybaveného míchadlem, topným pláštěm a kondenzátorem, a vyhřátého na teplotu 60 °C, se vnese 26 g hydratovaného

sojového fosfatidylcholinu (Nattermann) se 2 g dicetylfosfátu a 106 g chloroformu a vše se míchá až do úplného rozpuštění. Lpidový roztok se filtruje přes sterilní filtr 3 a vnese se jako náplň do kolony 4 z nerezavějící oceli o objemu 316 litrů, s topným pláštěm, vyplněné 250 paralelně umístěnými trubicemi z nerezavějící oceli 304 o délce 1 m, pomocí peristaltického čerpadla 2. Přebytek roztoku se odstraňuje, rozpouštědlo se odpařuje a lipidy se povlékají za teploty 80 °C, při cirkulaci vzduchu ze dna kolony.

Skleněný reaktor 5 o objemu 2 litrů, opatřený míchadlem, topným pláštěm a kondenzátorem, se naplní 849 g iopamidolu, 1196 g vody, 0,54 g EDTA a 1,60 g Tris a zahřívá na teplotu 90 °C za míchání, až se dosáhne úplného rozpuštění. Iopamidolový roztok se potom filtruje, převede do skleněného reaktoru 6 a z něho na kolonu 4. Roztok se cirkuluje za teploty 75 °C mezi reaktorem 6 a kolonou 4 pomocí zubového čerpadla 7. Vzniklá suspenze liposomu se potom extruduje filtrem 8, zachycuje v reaktoru 9 a potom zahušťuje za použití mikrofiltračního systému 10 pomocí čerpadla 11. Koncentrovaný roztok se promývá roztokem chloridu sodného 12 k eliminaci volného iopamidolu (diafiltrace). Obvyklý poměr jodu k lipidu (I/L), pro řadu experimentů provedených za rozdílných experimentálních podmínek, je v rozmezí od 2,5 do 3,5, s koncentrací lipidů od 25 do 35 mg/ml, se střední velikostí liposomu 570 nm.

Produkční jednotka může být sterilizována (například párou) a předpokládá se, že je aseptickou produkční jednotkou pro velkovýrobní přípravu s uzavřeným okruhem.

Příklad 2

Příklad 1 se opakuje v experimentálním celkovém uspořádání, které je znázorněno na obr. 5, ale velikost je ve větším měřítku, které odpovídá součiniteli čtyři. Do skleněného reaktoru 1 o objemu 3 litru, vybaveného míchadlem, topným pláštěm a kondenzátorem, a vyhřátého na teplotu 60 °C, se vnese 518,6 g hydratovaného sojového fosfatidylcholinu (Nattermann) se 41,4 g dicetylfosfátu a 2130,0 g chloroformu a vše se míchá až do úplného rozpuštění. Lipidový roztok se filtruje přes 0,22 µm sterilní filtr 3 za použití peristaltického čerpadla 2. Liposomový roztok se potom přenese do kolony 4 z nerezavějící oceli o objemu 316 litrů, s topným pláštěm, vyplněné 1000 paralelně umístěnými trubicemi z nerezavějící oceli 304 o délce 1 m, a přebytek lipidového roztoku se odstraní. Chloroform se odpařuje a vysušené lipidy se povlékají při teplotě 80 °C, při cirkulaci vzduchu ze dna kolony.

Reaktor 5 z nerezavějící oceli o objemu 7 litrů (316L), opatřený míchadlem, topným pláštěm a kondenzátorem, se naplní 2920 g iopamidolu, 4110 g vody, 1,87 g EDTA a 5,50 g Tris (kyselina chlorovodíková se přidá podle potřeby k odsažení hodnoty pH 7,2) a vše se zahřívá na teplotu 90 °C za míchání, až se dosáhne úplného rozpuštění. Iopamidolový roztok se potom vede přes sterilní filtr (neznázorněno), přemístí na kolonu 4 za použití zubového čerpadla 7 a určitou dobu cirkuluje za teploty 75 °C mezi reaktorem 6 a kolonou 4. Vzniklá suspenze liposomu, získaná v reaktoru 6, se potom extruduje filtrem 8 za teploty 75 °C a liposomy se zachycují v reaktoru 9. Liposomový roztok se potom koncentruje za použití mikrofiltračního systému 10. Běžný poměr jodu k lipidu (I/L), pro řadu experimentů probíhajících za rozdílných experimentálních podmínek, je v rozmezí od 2,5 do 3,5, s koncentrací lipidů od 25 do 35 mg/ml, se střední

velikostí liposomu 570 nm. Sypná hmotnost lipidového povlaku se mění jako funkce experimentálních podmínek a stanoví se od 0,08 do 0,05 g/cm^3. Avšak nejlepší liposomy se připraví se sypnou hmotností od 0,01 do 0,02 g/cm^3.

Příklad 3

Příklad 2 se opakuje za použití azeotropické směsi chloroformu a methanolu v objemovém poměru 87:13 jako rozpouštědla. Po odpaření rozpouštědla za teploty 60 °C při sníženém tlaku se do reaktoru přidá horká destilovaná voda. Teplota přidávané vody je nad teplotou zvratu (54 °C) použitých lipidů. Získaný povlak expandovaných trojrozměrných lipidů se nechá hydratovat a vzniklé liposomy jsou rozděleny homogenně v kapalině. Liposomy MLV typu se tvoří ve vysokém výtěžku. Po přibližně 1 hodině suspenze liposomů, obsahující 5 mg/ml liposomů, se extruduje za teploty 60 °C 2 µm polykarbonátovou membránou (Nuclepore) a po ochlazení na teplotu místnosti se koncentruje na 30 mg/ml mikrofiltrací za použití 0,22 µm mikrofiltračního systému Prostak (Millipore).

Ke koncentrované liposomové suspenzi se potom přidá 1 litr vodného roztoku, který obsahuje 1040 g (S)-N,N'-bis-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-2,4,6-trijod-5-laktamido-isoftalamidu (iopamidolu), to znamená 520 g/l kovalentně vázaného jodu, za teploty 60 °C. Výsledná směs o objemu 2 litrů, s koncentrací jodu 260 g/l, se inkubuje za teploty 60 °C po dobu přibližně 30 minut a po této době se koncentrace jodu mimo a uvnitř liposomového jádra vyrovná. Výsledný přípravek se koncentruje na 30 g lipidů na litr. Poměr zachyceného jodu k lipidu (I/L) činí přibližně 4,0.

Příklad 4

Skleněné kolona o výšce 500 mm a průměru 50 mm, se naplní Raschigovými kroužky a provozuje jako skrápěný věžový reaktor. Lipidový roztok, obsahující 50 g/l směsi distearoylfosfatidylcholinu (DSPC), cholesterolu a dicetylfosfátu v molárním poměru 5:4:1 v chloroformu, se nechá stékat kolonou naplněnou 35 vrstvami Raschigových kroužků, které se rozprostírají na niklovém pletivu jako nosiči, až poslední vrstva u dna se důkladné napustí roztokem. Přebytek roztoku se odstraní a proud horkého dusíku o teplotě 80 °C se vhání ode dna do reaktoru. Lipidový povlak se suší po dobu 2 hodin. Průtok dusíku se zastaví a reaktor napojí na vakuum 133 až 266 Pa. Povlak se nechá sušit, až se veškerý chloroform odstraní. Po odpaření rozpouštědla se za teploty 60 °C do roztoku přidá iomeprolový roztok, který má koncentraci jodu 260 g/l. Povlak expandovaného trojrozměrného lipidu se nechá hydratovat po dobu 30 minut. Suspenze liposomů se extruduje 2 μm polykarbonátovou membránou (Nuclepore) za teploty 60 °C a po ochlazení na teplotu místnosti se koncentruje na 30 g lipidů na litr. Poměr zachyceného jodu k lipidu (I/L) je nad 4,0.

Stejný experiment se potom opakuje s retikulovaným uhlíkem, retikulovaným niklem a retikulovaným sklovitým uhlíkem, jako s náplní kolony. Sypná hmotnost trojrozměrné lipidové struktury, dosažená při těchto experimentech, je od 0,05 do 0,005 g/cm^3. Dostanou se liposomy s poměrem lipidu k jodu činícím 3,5 až 4,5.

Příklad 5

Skleněné kolona o výšce 500 mm s průměru 50 mm, se naplní dutými skleněnými kuličkami jako seskupením vytvořeným

z inertní náplně a provozuje se jako reaktor s fluidizovaným lůžem. Lipidový roztok, obsahující 50 g/l směsi dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC), cholesterolu a kyseliny dipalmitoylfosfatidové (DPPA) v molárním poměru 5:4:1 v azeotropické směsi cyklohexanu a ethanolu v objemovém poměru 69,5:30,5, se zavede do kolony, která obsahuje 100 mm vysoké lůže dutých skleněných kuliček, nesených porézní skleněnou fritou. Skleněné kuličky se nechají důkladně zvlhčit roztokem a jeho přebytek se odstraní. Proud horkého vzduchu, o teplotě 80 °C, se probublává ode dna reaktorem a kuličky se fluidizují až lipidový povlak je takřka suchý. Tok vzduchu se zastaví, reaktor se napojí na vakuum 133 až 266 Pa a povlak se nechá sušit, až se rozpouštědlo úplně odstraní. Po odpaření rozpouštědla se do reaktoru přidá hmotnostně 4% vodný roztok hydrochloridu lidokainu, o hodnotě pH 7,2, za teploty 60 °C. Vzniklý liposomový roztok se extruduje 2 µm polykarbonátovou membránou (Nuclepore) za teploty 80 °C a po ochlazení na teplotu místnosti se koncentruje na 35 g lipidů na mililitr. Množství zachyceného lidokainu v liposomech činí 0,35 mmol lidokainu na 1 g lipidu.

Měnící se expanze (20 až 80 %) lůže během fluidizace ukazuje malý vliv na množství povlaku.

Příklad 6

Příklad 4 se opakuje za použití skleněné kolony o výšce 500 mm bez inertní náplně. Kolona se naplní 100 ml lipidového roztoku (80 g/l), který byl připraven z azeotropických směsí ethanolu a cyklohexanu, chloroformu a methanolu a isopropanolu a hexanu. Organické rozpouštědlo se nejprve odpařuje za teploty 55 °C a tlaku 39,9 kPa a potom za teploty 70 °C a tlaku 1333 Pa, až se vytvoří pěnový suchý povlak. Ve

všech případech získaná expandovaná trojrozmérná lipidová struktura se potom hydratuje za teploty 70 °C vodným roztokem iomeprolu, aby se připravil liposom enkapsulovaný v iomeprolových suspenzích. Po extrusi za teploty 70 °C přes 0,6 μm polykarbonátovou membránu (Nuclepore) se liposomová suspenze koncentruje. Obvyklý pomér jodu k lipidu (I/L), pro řadu experimentů prováděných za rozdílných experimentálních podmínek, je v rozmezí od 1,9 do 2,5, s koncentracemi lipidů od 25 do 35 mg/ml. Stanoví se, že sypná hmotnost expandované lipidové struktury je v rozmezí od 0,05 do 0,001 g/cm^3.

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
DOŠLO
1. V. 96
Č.j.
37124

7770-76

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Prekurzor liposomové vezikuly ve formě suchého lipidového povlaku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že lipidový povlak je trojrozměrná expandovaná struktura se sypnou hmotností pod 0,1 g/cm^3, výhodně pod 0,08 g/cm^3.

2. Prekurzor vezikuly podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sypná hmotnost trojrozměrné expandované struktury je mezi 0,05 a 0,001 g/cm^3.

3. Prekurzor vezikuly podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sypná hmotnost trojrozměrné expandované struktury je mezi 0,02 a 0,01 g/cm^3.

4. Prekurzor vezikuly podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že trojrozměrná expandovaná struktura je nesena sítí z inertního porézního materiálu.

5. Prekurzor vezikuly podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že inertním porézním materiálem je seskupení z trubice nebo seskupení inertní náplně.

6. Prekurzor vezikuly podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že trubice má vnitřní průměr od 0,5 do 5 mm a tlušťkou stěny od 0,5 do 2 mm.

7. Prekurzor vezikuly podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že inertní náplň je zvolena ze souboru zahrnujícího duté skleněné kuličky, retikulovaný uhlík, retikulovaný sklovitý uhlík, retikulovaný kov, skleněnou nebo kovovou vlnu a skleněná nebo kovová vlákna.

8. Prekurzor vezikuly podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že lipidy jsou zvoleny ze syntetických nebo přírodních, nasycených a nenasycených fosfolipidů včetné kyseliny fosfatidové, fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidylinositolu a jejich směsí.

9. Prekurzor vezikuly podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že lipidy dále obsahují látky zvolené z dicetylfosfátu, cholersterolu, ergosterolu, fytosterolu, sitosterolu, lanosterolu, α-tokoferolu, kyseliny stearové, stearylaminu a jejich směsí.

10. Způsob přípravy liposomových vezikul se zvýšenou zachycovací kapacitou, rozpuštěním alespoň jednoho lipidu vytvářejícího film v přinejmenším jednom organickém rozpouštědle za vzniku roztoku v reakční nádobě, vytvořením povlaku lipidů odpařením rozpouštědla, stykem lipidového povlaku s vodným roztokem fáze nosné látky a vytvořením liposomových vezikul zachycujících roztok nosné látky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že lipidový povlak získaný odpařením rozpouštědla je expandovaná trojrozměrná porézní struktura, jejíž sypná hmotnost je pod 0,1 g/cm^3, výhodně pod 0,08 g/cm^3.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sypná hmotnost je mezi 0,05 a 0,001 g/cm^3.

12. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že reakční nádoba obsahuje síť z inertního porézního materiálu nebo náplň, která slouží jako nosná látka nebo jako základní hmota pro povlékání lipidů.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že náplň je zvolena ze souboru zahrnujícího retikulovaný uhlík, retikulovaný sklovitý uhlík, retikulovaný kov, skleněnou nebo kovovou vlnu a skleněná nebo kovová vlákna.

14. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že inertní porézní náplní jsou duté skleněné kuličky, které jsou fluidizovány.

15. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že inertní náplň zahrnuje Raschigovy kroužky naplněné v koloně jako reakční nádobě a lipidový roztok se zavádí svrchu při využití skrápění.

16. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že po odpaření organického rozpouštědla je lipidový povlak uveden do styku s vodnou fází nosné látky a která se zavádí na nižší konec kolony.

17. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že odpařování se provádí nad teplotou místnosti nebo za sníženého tlaku.

18. Způsob podle nároku 10 nebo 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že odpařování se provádí pomocí probublávání vzduchu nebo inertního plynu, výhodně dusíku, reakční nádobou.

19. Způsob podle nároku 10 nebo 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že organické rozpouštědlo se vybere z chloroformu, petroletheru, methanolu, ethanolu, propanolu,

isopropanolu, n-butanolu, terc.-butanolu, pentanolu, hexanolu, pentanu, hexanu, heptanu, cyklohexanu a jejich směsi.

20. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že organickým rozpouštědlem je azeotropická směs dvou rozpouštědel.

21. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rozpouštědlem je směs ethanolu s cyklohexanem, chloroformu s methanolem a isopropanolu s hexanem.

22. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vodná fáze nosné látky obsahuje biologicky aktivní látku.

23. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní látkou je kontrastní činidlo.

24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kontrastním činidlem je jodované rentgenové kontrastní činidlo.

25. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr jodu k lipidu u liposomových vezikul je alespoň 2,75.

26. Suspenze liposomových vezikul obsahující disperzi hydratovaných lipidových částic v kapalině jako nosné látce, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vezikuly jsou získány hydratací a dispergováním prekurzoru liposomových vezikul podle nároků 1 až 9 v této nosné látce.

27. Kontrastní činidlo, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje suspenzi liposomových vezikul podle nároku 26.

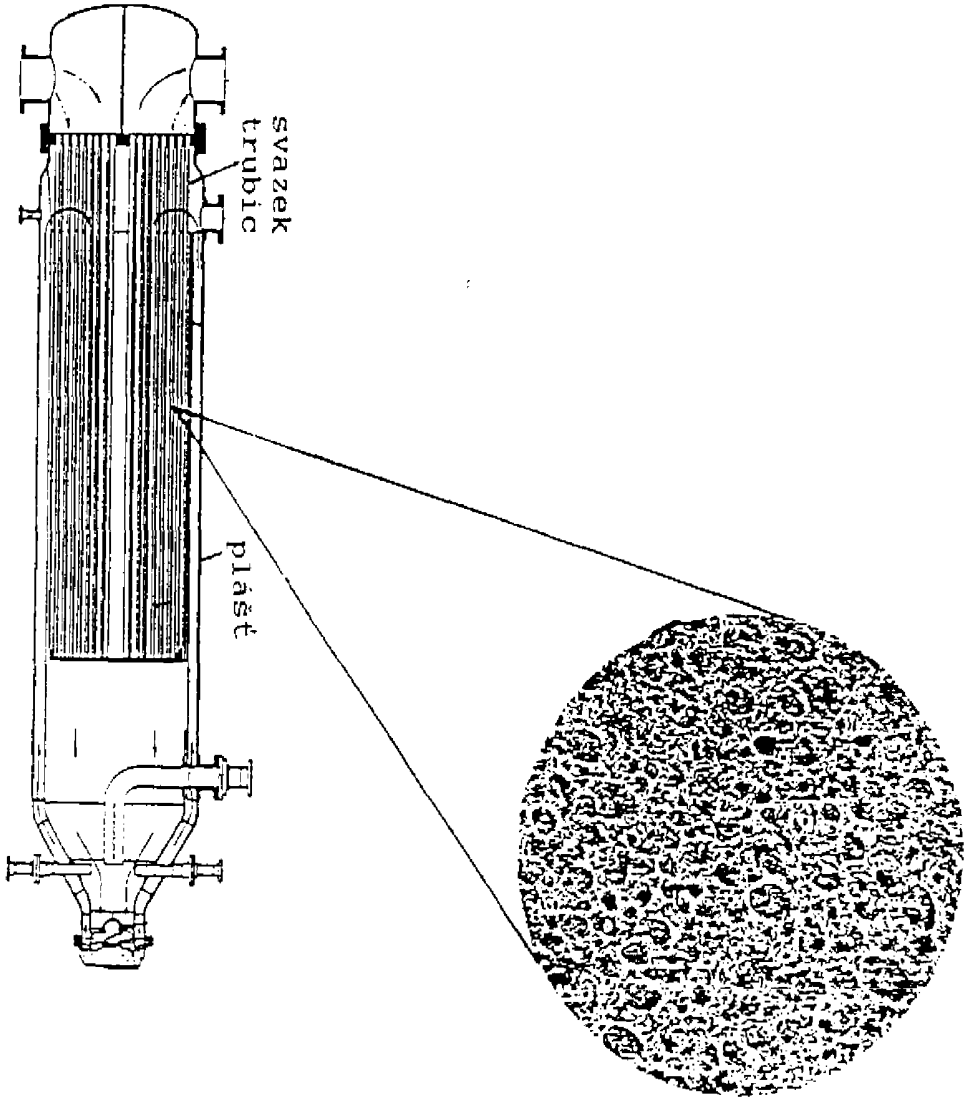
28. Použití trojrozměrných lipidových struktur podle nároků 1 až 9 k přípravě liposomů s vysokou zachycovací kapacitou.

29. Použití trojrozměrných lipidových struktur podle nároků 1 až 9 k přípravě diagnostických kontrastních činidel.

30. Zařízení pro přípravu liposomů s vysokou zachycovací kapacitou, k provádění způsobu podle nároků 10 až 25, zahrnující reakční nádobu s přívodem a odvodem, přívod vakua, přípravek pro chlazení a zahřívání, kontrolní přístroje a náplň, v y z n a č u j í c í s e t í m, že náplní je seskupení z těsně uspořádaných trubic z inertního materiálu, kde trubice mají vnitřní průměr od 0,5 do 5 mm a tloušťkou stěny mezi 0,5 a 2 mm.

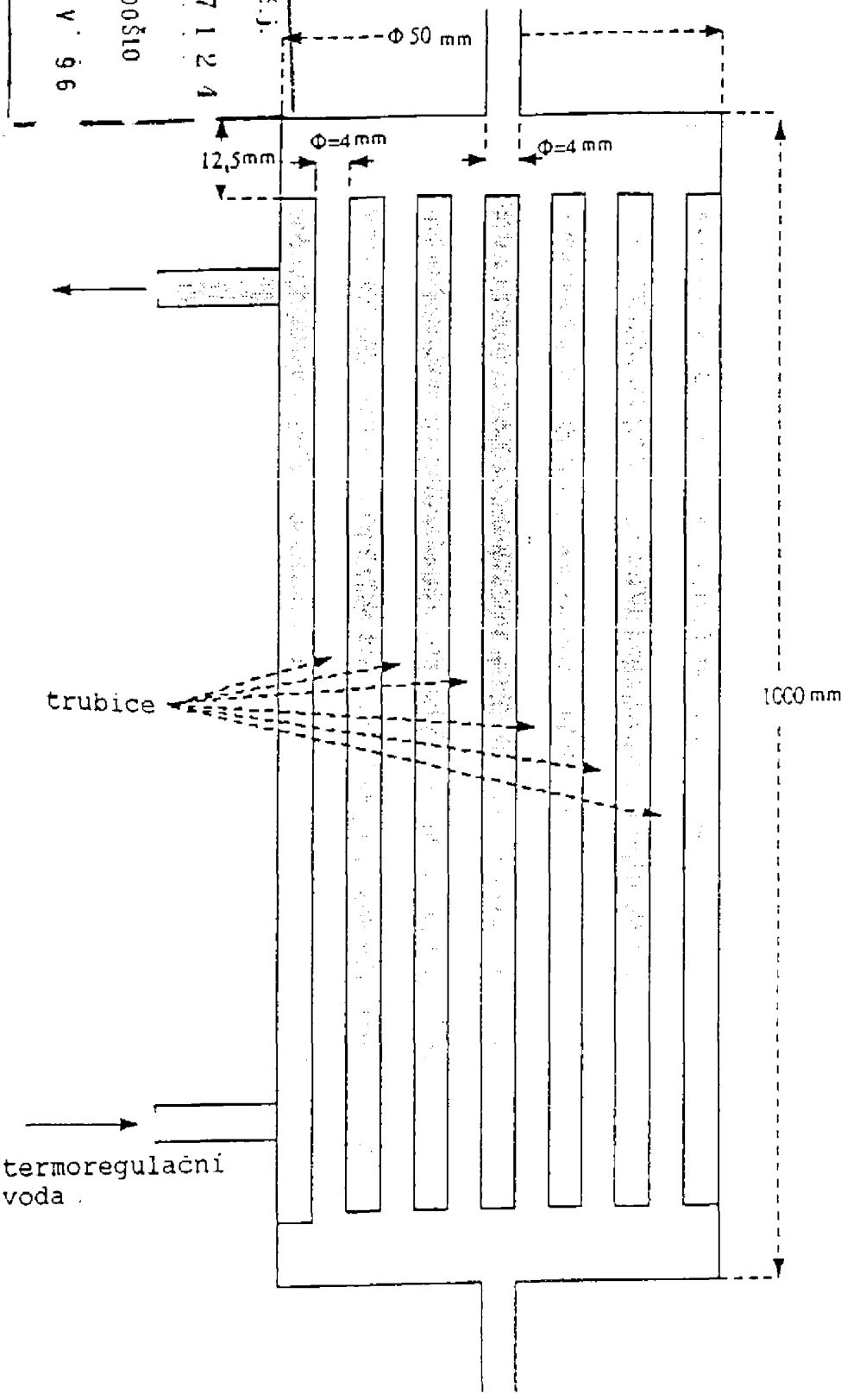
1110 10

č.j.
3712 4
DOŠLO
21. V. 96
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



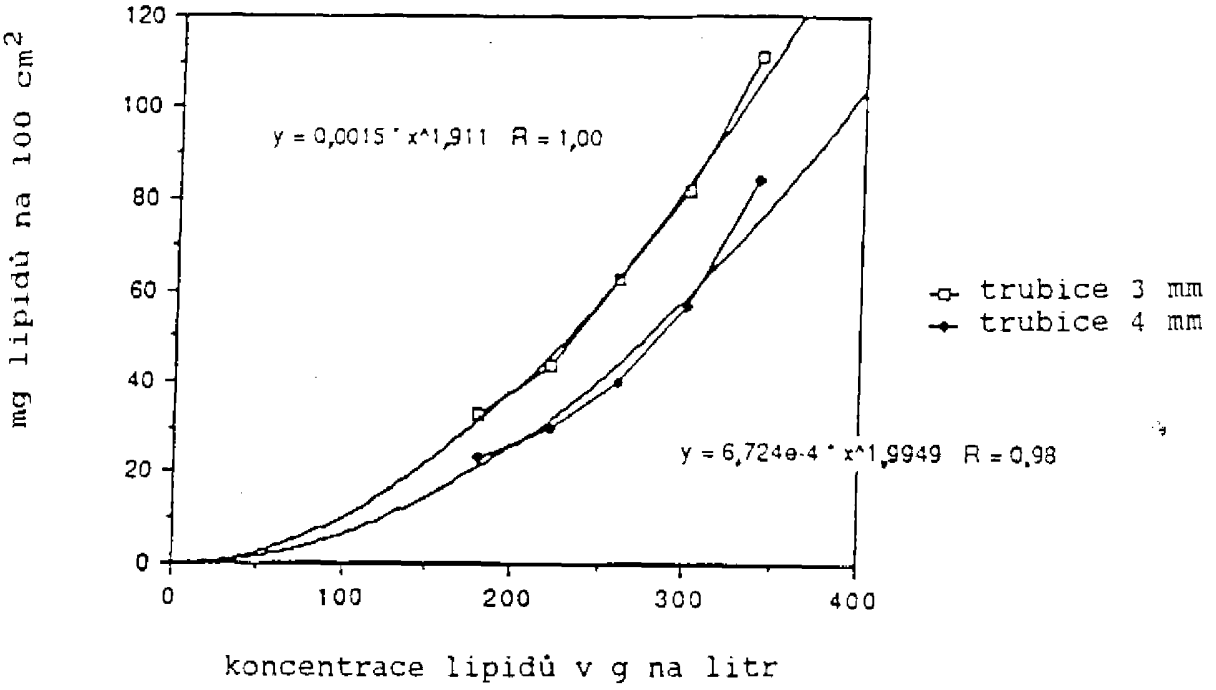
Obr. 1

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO 21. V. 96
č.j. 037124

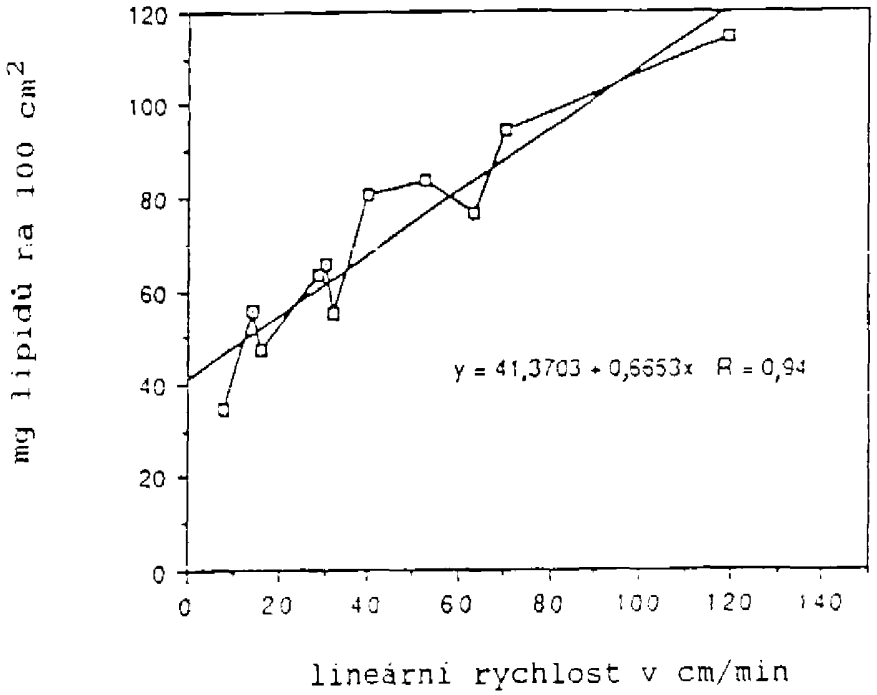


Obr. 2

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
1. V. 96
BOŠLO

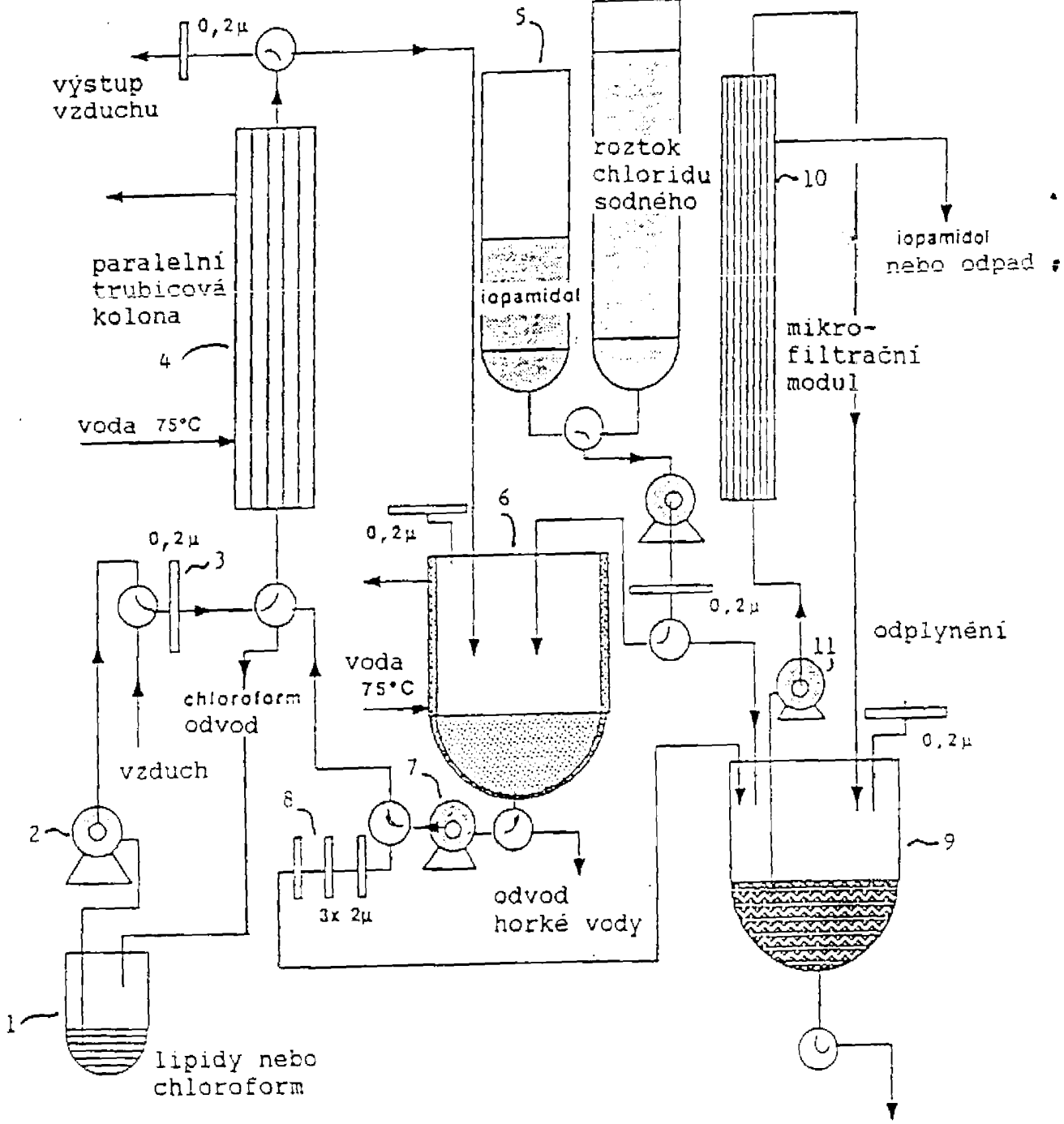


Obr. 3



Obr. 4

č.j. 037124
DOŠLO 21 V 96
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



Obr. 5