



**SUOMI—FINLAND**  
**(FI)**

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 70137  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT**

(45)

(51) Kv.lk./Int.Cl.<sup>4</sup> A 61 K 31/20, 31/575,  
31/685, 37/22, 9/10

(21) Patentihakemus — Patentansökning	801336
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	25.04.80
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	25.04.80
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	08.11.80
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.02.86

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 07.05.79  
Japani-Japan(JP) 55476/79

- (71) The Green Cross Corporation, 1-47, Chuo-1-chome, Joto-ku, Osaka,  
Japani-Japan(JP)
- (72) Hiroyuki Okamoto, Akashi-shi, Yoshio Tsuda, Kyoto,  
Kazumasa Yokoyama, Toyonaka-shi, Japani-Japan(JP)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä suonensisäiseen injektioon tarkoitettun stabiilin rasva-  
emulsion valmistamiseksi - Förfarande för framställning av en  
stabil fettemulsion för intravenös injektion

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä infuusina annetta-  
van ravintonesteen ja erityisesti suonensisäisesti injektoita-  
van rasvaemulsion valmistamiseksi.

Tavanomaisten rasvaemulsioiden valmistukseen on käytetty  
emulgointiaineita, kuten ionittomia pinta-aktiivisia aineita,  
munan keltuaisen fosfolipidejä ja soijapavun fosfolipidejä. Emul-  
sion ominaisuudet vaihtelevat luonnollisesti riippuen käytetystä  
emulgointiaineesta tai emulsioapuaineesta. Koska tässä käsitelty  
emulsio on infuusiona annettava ravintoneste, niin emulsion toivo-  
taan antamisen jälkeen tulevan nopeasti käytetyksi in vivo energia-  
lähteenä. Jotta keho käyttäisi suonensisäisesti injektoidun rasvan  
polttaen sen nopeasti, niin rasva ei saa jäädä pitkäksi aikaa vereen,  
ja sen tulee metabolisoitua saostumatta ja kerääntymättä kudoksiin  
ja elimiin, kuten maksaan ja pernaan.

Edellä olevista syistä on kehitettävä sellainen emulsio, jonka hiukkaset ovat riittävän pieniä ja pysyviä. Nyt on keksitty, että lisäämällä useita emulgointiaineita ja emulsioapuaineita tavano-maiseen suonensisäisesti annettavaa injektoitavaan emulsioon, joka sisältää soiijaöljyä, vettä ja munankeltuaisen fosfolipidejä, ja homogenoimalla emulsio, saadaan valmistettua rasvaemulsio, jolla aikaisempiin tunnettuihin emulsioihin verrattuna on hienommat hiukkaset, joka on pysyvämpi ja nopeammin käytetty energialähteenä in vivo. Esillä oleva keksintö perustuu tähän havaintoon.

Keksinnön kohteena on suonensisäisenä injektiona annettavan rasvaemulsion valmistusmenetelmä, jolle on tunnusomaista, että homogenisoidaan seos, joka sisältää a) 5-50 p/vol-% soiijaöljyä, b) munankeltuaisfosfolipidejä suhteessa soiijaöljyn painosuhteessa 1:4 - 1:25, c) 0,01-0,30 p/vol-% 12-20 hiiliatomia sisältävää rasvahappoa tai sen suolaa, d) 0,005-0,50 p/vol-% kolesterolia tai kolesterolijohdannaista, e) loppuosa vettä ja f) glyserolia tai glukoosia isotonisen tasapainon aikaansaamiseksi kunnes emulsion hiukkasten keskimääräinen halkaisija on korkeintaan 0,1  $\mu$ m. Ilmaisulla p/vol-% tarkoitetaan liunneen tai dispergoidun faasin paino-%:a emulsion tilavuusyksikköä kohti.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä soiijaöljy on erittäin puhdasta soiijaöljyä, joka on valmistettu esimerkiksi vesihöyrytislauksen menetelmällä [H.J.Lips, J.Am.Oil Cemist.Soc., 27, 422-423 (1950)] raffinoidusta soiijaöljystä, jonka puhdistetun soiijaöljyn puhtaus triglyseridi-, diglyseridi ja monoglyseridipitoisuuden perusteella on vähintään 99,9 %. Vaikkei soiijaöljyn ja veden suhde ole mitenkään erityisesti rajoitettu, niin se on yleensä 0,05-0,43, edullisesti 0,05-0,2.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä puhdistettu munankeltuaisen fosfolipidi voidaan valmistaa tavallisella tavalla fraktioimalla orgaanisella liuottimella seuraavasti: liuokseen, jossa on 130 g raakaa munankeltuaisen fosfolipidejä kylmässä n-heksaanin (100 ml) ja asetonin (100 ml) seoksessa, lisätään vähitellen samalla sekoittaen 1170 ml kylmää asetonia. Liukenematon aines suodatetaan ja liuotetaan uudelleen kylmään n-heksaanin (260 ml) ja asetonin (130 ml) seokseen. Seokseen lisätään sekoittaen 1170 ml kylmää asetonia. Liukenematon aines suodatetaan, ja sen sisältämät liuottimet haihdutetaan, jolloin saadaan 60 g kuivaa ainetta, joka sisältää 70 - 80 % fosfatidyylikoliinia, 12 - 25 % fosfatidyylietanoliamiinia ja muita fosfolipidejä, kuten fosfatidyyli-inositolia, fosfatidyyli-

seriiniä, sfingomyeliiniä ja lysofosfatidyylikoliinia [D.J.Hanahan et al., J.Biol. Chem., 192, 623-628 (1951)].

Käytettävät rasvahapot voivat olla sellaisia 12-20 hiiliatomia sisältäviä vapaita rasvahappoja, joita käytetään lääkkeissä, tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja. Esimerkkejä ovat steariinihappo, öljyhappo, linolihappo, palmitiinihappo, linoleenihappo ja niiden kalium- tai natriumsuolat. Käytettävä määrä on sellainen, että emulsion lopulliseksi pitoisuudeksi saadaan 0,01-0,30, edullisesti 0,04 - 0,07 p/vol-% . Kolesterolit ovat sellaisia, jotka sopivat käytettäväksi suonensisäisesti annettavassa lääkinnässä. Lisättävä määrä on sellainen, että emulsion loppukonsentraatioksi saadaan 0,005-0,50 p/vol-%.

Keksinnön mukainen emulsio valmistetaan muodostamalla etukäteen soijaöljyn, munankeltuaisfosfolipidien ja 12-20 hiiliatomia sisältävien rasvahappojen tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen ja kolesterolin seos, joka sekoitetaan veteen saatu seos karkeaemulgoidaan tavallisella sekoittimella, ja karkea emulsio homogenoidaan halutun emulsion saamiseksi. Homogenointi voidaan suorittaa tavallisella tavalla ultraäänikäsittelyllä tai paineatomisoinnilla. Haluttu emulsio saadaan esimerkiksi johtamalla nestekompositio 10 kertaa Manton-Gaulin-homogenisaattorin lävitse paineella  $500 \text{ kg/cm}^2$  [R.P.Geyer et al., J.Am. Oil Chem., Soc., 32, 365-370 (1955)].

Keksinnön mukaisesti emulsioon voidaan lisätä isotoninen määrä esimerkiksi glyserolia, glukoosia tms. ainetta, jolla emulsio saadaan isotoniseksi. Isotoniseksi tekevä aine voidaan lisätä emulsioon vesiliuoksena valmistettaessa karkeaa emulsiota tai sen jälkeen.

Verrattuna tavanomaisiin rasvaemulsioihin, joissa on käytetty emulgointiaineina soijalipidejä, ionittomia pinta-aktiivisia aineita ja munankeltuaisfosfolipidejä, keksinnön mukaisesti valmistettu suonensisäiseen injektioon tarkoitettu rasvaemulsio on fysikaalisen pysyvyytensä sekä vähäisempien sivuvaikutustensa johdosta ylivoimaisesti parempi. Keksinnön mukaisesti valmistettu emulsio sisältää dispergoituneina öljypisaroihin, joiden keskimääräinen halkaisija on  $0,1 \mu\text{m}$  tai pienempi, jolloin yhdenkään pisan halkaisija ei ylitä  $1 \mu\text{m}$ . Näin hieno dispersio pysyy muuttumattomana pitkiä aikoja.

Keksinnön mukaisen 10-%:isen rasvaemulsioon LD<sub>50</sub> oli rotilla 200 ml tai suurempi rotan kg:aa kohti ja 20-%:isen rasvaemulsioon LD<sub>50</sub> oli 150 tai suurempi/kg. Antamisen tapahtuessa normaalinopeudella ei hemolyysiä esiintynyt.

Keksinnön mukaista rasvaemulsiota käytetään seuraavasti: 10-%:ista rasvaemulsiota annetaan infuusiona kerran vuorokaudessa 300-1000 ml. Annos määräytyy sopivasti kehonpainon ja oireiden mukaan; suonensisäisesti annetun rasvan määrä on 2 g (20 ml emulsiota) tai vähemmän vuorokaudessa kehon kg:aa kohti.

Keksintöä valaistaan yksityiskohtaisesti seuraavissa esimerkeissä ja koe-esimerkeissä.

#### Esimerkki 1

20,0 g:aan puhdistettua soijaöljyä lisättiin 2,4 g puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä, 0,05 g natriumoleaattia ja 0,04 g kolesterolia. Seosta kuumennettiin 65-75°C:seen liuoksen saamiseksi. Liuokseen lisättiin 5,0 g glyserolia ja 173 ml injektio-tarkoitukseen sopivaa tislattua vettä, jotka oli kuumennettu 65-75°C:een. Saatu seos karkeaemulgoitiin Homomixer-sekoittimella. Karkea emulsio hienoemulgoitiin johtamalla 10 kertaa Manton-Gaulin-homogenisaattorin lävitse aluksi 120 kg/cm<sup>2</sup> paineella ja lopuksi 500 kg/cm<sup>2</sup> paineella, jolloin saatiin homogenoitu, erittäin hienojakoinen rasvaemulsio.

#### Esimerkki 2

40,0 g:aan puhdistettua soijaöljyä lisättiin 2,4 g puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä, 0,05 g natriumoleaattia ja 0,04 g kolesterolia. Seos kuumennettiin 65-75°C:seen liuoksen saamiseksi. Liuokseen lisättiin 65-75°C:seen kuumennettua glyserolia (5,0 g) ja injektio-tarkoitukseen sopivaa tislattua vettä (173 ml). Saatu seos karkeaemulgoitiin Homomixer-sekoittimella. Karkea emulsio hienoemulgoitiin johtamalla 10 kertaa Manton-Gaulin-homogenisaattorin lävitse aluksi 120 kg/cm<sup>2</sup> paineella ja lopuksi 500 kg/cm<sup>2</sup> paineella, jolloin saatiin homogenoitu, erittäin hienojakoinen emulsio.

#### Koe-esimerkki 1

Emulsioon stabiliteetin riippuvuutta emulgointiaineen koostumuksesta kokeiltiin vertailukokeessa. Valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla emulsionäytteitä käyttäen seuraavia emulgointi-ainesysteemejä: puhdas munankeltuaisfosfolipidi yksinään, puhdis-

tettu munankeltuaisfosfolipidi ja kolesteroli tai vapaa rasvahappo, ja keksinnön mukainen yhdistelmä, joka sisälsi puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä, kolesterolia ja vapaata rasvahappoa.

Kunkin emulsion hiukkasten koko määritettiin elektronimikroskoopilla välittömästi valmistuksen jälkeen ja 24 kuukauden säilytyksen jälkeen 4°C:ssa. Elektronimikroskooppi oli mallia JEM-T<sub>7</sub> (Nippon Denshi Co.). Keskimääräinen hiukkaskoko määritettiin mittamalla hiukkasten halkaisijat hiilireplikatekniikalla otetuista valokuvista. Havaittiin, että emulsiossa, joka oli valmistettu käyttämällä emulgointiainesytemiä: puhdistettu munankeltuaisfosfolipidi, vapaa rasvahappo ja kolesteroli, hiukkaset olivat hienoja ja tasakokoisia ja emulsio oli pitkiä aikoja stabiili, mikä osoitti tämän emulsion olevan parhaan neljästä valmistetusta emulsiosta.

Taulukko 1

Emulsion hiukkasten halkaisija ja emulsion varastointikestävyys

Näyte nro	Emulgointiaine	Rasvaemulsion hiukkasten halkaisija (µm)	Hiukkasten halkaisija 24 kuukauden varastoinnin jälkeen 4°C:ssa (µm)
I	Puhdistettu munankeltuaisfosfolipidi	0,15 ± 0,03	0,25 ± 0,06
II	Puhdistettu munankeltuaisfosfolipidi ja kolesteroli	0,13 ± 0,03	0,20 ± 0,03
III	Puhdistettu munankeltuaisfosfolipidi ja rasvahappo	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,03
IV	Puhdistettu munankeltuaisfosfolipidi, kolesteroli ja rasvahappo (keksinnön mukainen)	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,03

Koe-esimerkki 2

Valmistettiin neljä rasvaemulsiota samalla tavalla kuin koe-esimerkissä 1 käyttämällä kuitenkin soiijaöljyä, jonka linolihapossa oli  $^{14}\text{C}$ -merkitty hiiliatomi. Neljälle ryhmälle 16 tuntia paastoneita Wistar-rottia (kunkin paino 150 g) annettiin vastaavasti häntäverisuonen kautta edellä mainittuja emulsioita 20 ml (2 g soiijaöljyä) kehon-kg:aa kohti. Injektion jälkeen kunkin rotan uloshengittämää ilmaa koottiin jatkuvasti 6 tunnin ajan ja ilman radioaktiivisuus mitattiin, jotta voitaisiin verrata eri emulsioiden metabolisoitumisnopeutta ja siten niiden arvoa energialähteenä. Edellä olevan kokeen jälkeen rotat tapettiin ja niiden vatsat avattiin ja jäljellä oleva radioaktiivisuus määritettiin plasmasta, maksasta, pernasta ja keuhkoista.

Lisäksi emulsiota annettiin injektioina rottien häntäverisuoneen edellä kuvatulla tavalla, ja kustakin rotasta otettiin verinäyte silmänpohjasta 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 ja 180 minuuttia injektion jälkeen. Plasman rasvapitoisuus määritettiin erottamalla linkoamalla neutraali rasva ja sen puoliintumisaika ( $T_{1/2}$ ) määritettiin asetyyliasetoni-menetelmällä. Tulokset nähdään taulukossa 2.

Taulukko 2

Näyte nro	Puoliintu- misaika ( $T_{1/2}$ ) plasmassa (min.)	Talteenosaatu radioaktiivi- suus 6 tunnin aikana in- jektion jälkeen uloshen- gitetystä ilmasta (% annoksesta)	Radiokatiivisuuden jakautuminen 6 tunnin kuluttua injektioista			
			Plasma	Maksa	Perma	Keuhkot
I	18.5	20.1 ± 2.5*	0,4 ± 0.05*	46.1 ± 6.4*	5.2 ± 1.0*	2.3 ± 0.1
II	28.3	25.3 ± 2.1	1.3 ± 0.2	31.5 ± 2.8	2.4 ± 0.4	1.6 ± 0.2
III	34.4	27.6 ± 3.1	1.6 ± 0.2	30.1 ± 5.8	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1
IV	35.2	29.7 ± 2.6	1.5 ± 0.1	33.6 ± 4.9	2.2 ± 0.5	1.8 ± 0.03

Huom. \* Eroaa merkitsevästi IV:n arvoista.

70137



Koe-esimerkki 3

Vertailukoe

Lähtöaineina käytettiin 20,0 g puhdistettua soiijaöljyä ja 2,4 g puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä. Kun lähtöaineet oli sekoitettu erillaisten lisäaineiden kanssa, seos kuumennettiin 65-77<sup>o</sup> C:seen liuoksen aikaansaamiseksi. Liuokseen lisättiin 5,0 g glyserolia tai glukoosia isotoniseksi aineeksi ja 173 ml 65-75<sup>o</sup> C:seen kuumennettua tislattua vettä injektiota varten, ja saatu seos karkeaemulgoitiin Homomixerin avulla. Karkea emulsio hienoemulgoitiin ajamalla se 10 kertaa Manton-Gaulin-homogenisaattorin läpi alkupaineen ollessa 120 kg/cm<sup>2</sup> ja kokonaispaineen 500 kg/cm<sup>2</sup>, homogenisoidun ja hienojakoisen rasvaemulsiovalmisteen tuottamiseksi. Näin saatujen valmistaiden vertailukokeet suoritettiin mittaamalla emulsion stabiilisuus koostumuksen funktiona. Koostumukset ilmenevät taulukosta 3.

Tulokset havaittiin ja niitä verrattiin mittaamalla emulsion hiukkashalkaisijan muutos.

Jokaisen emulsionäytteen hiukkashalkaisija mitattiin elektronimikroskoopilla heti valmistumisen jälkeen, sen jälkeen kun tuotetta oli kuumennettu 115<sup>o</sup>C:ssa 12 minuuttia sen steriloinniseksi ja säilytyksen jälkeen, jolloin säilytysajat olivat 1 ja 6 kuukautta ja lämpötila 4<sup>o</sup>C. Käytetty elektronimikroskooppi oli mallia JEM-Ts7, Nippon Denshi Co. Keskimääräinen hiukkashalkaisija määritettiin mittaamalla hiukkaskoko valokuvasta, joka otettiin hiilikopiotekniikalla. Tulokset esitetään taulukossa 3.

Taulukosta käy ilmi, että keksinnön mukainen menetelmä puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä, rasvahappoa tai sen suolaa ja kolesterolia sisältävän rasvaemulsion valmistamiseksi on erinomaisen tehokas tuottamaan tasaisia ja hienojakoisia hiukkasia sisältävä emulsio, jolla on erinomainen säilyvyys lämpökäsittelyn ja pitkäaikaisten varastoinnin aikana.

Taulukko 3

Näyte nro*	Kirjallisuusviite	Komponentti					Rasvaemulsion hiukkasten halkaisija (µm)			
		Soijaöljy	Munankeletuaisfosfoliipidi	Rasvahappo**	Kolesterololi	Heti tuotattamisen jälkeen	Heti lämpökäsittelyn jälkeen 115°C:ssa, 12 min.	säilytyksen jälkeen 4°C	säilytyksen jälkeen 6kk, 4°C	
I	Intralipid®	10 %	1,2 %	-	-	0,16 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,27 ± 0,05	
III		"	"	0,025 %	-	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,24 ± 0,04	
	DE-2406621	"	"	0,5 %	-	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,22 ± 0,04	
IV	Keksinnön mukainen	"	"	0,025 %	0,02 %	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,03	

\* : Näytteen numero hakemuksen esimerkissä 3.

\*\* : Natriumoleaatti

70137

Edellä kuvatun perusteella on illemistä, että keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettu rasvaemulsio, joka käsittää puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä, vapaita rasvahappoja ja kolesterolia sisältävän emulgointiaineyhdistelmän, sisältää verrattuna emulsioon, jonka ainoana emulgointiaineena on käytetty puhdistettua munankeltuaisfosfolipidiä, rasvahiukkaset hienojakoisempina emulsiona, joka pysyy homogeenisena pitkiä aikoja ja jota voidaan in vivo käyttää energialähteenä nopeammin, mitkä seikat osoittavat keksinnön mukaisesti valmistetun emulsion olevan huomattavasti parempi kuin tavanomaisella tavalla valmistetut rasvaemulsiot.

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä suonensisäiseen injektioon tarkoitettun, tasaisia ja hienojakoisia hiukkasia sisältävän stabiilin rasvaemulsionvalmistamiseksi, t u n n e t t u, siitä, että homogenisoidaan seos, joka sisältää

a) 5-50 p/vol-% soijaöljyä,

b) munankeltuaisfosfolipidejä painosuhteessa soijaöljyn 1:4-1:25,

c) 0,01-0,30 p/vol-% 12-20 hiiliatomia sisältävää rasvahappoa tai sen suolaa,

d) 0,005-0,50 p/vol-% kolesterolia tai kolesterolijohdannaisista,

e) loppuosa vettä ja

f) glyserolia tai glukoosia isotonisen tasapainon aikaansaamiseksi

kunnes emulsion hiukkasten keksimääräinen halkaisija on korkeintaan 0,1  $\mu\text{m}$ .

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että emulgoitujen hiukkasten halkaisija on korkeintaan 1  $\mu\text{m}$ .

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rasvahapon tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan määrä on 0,04-0,07 p/vol-%.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rasvahappo on steariinihappo, öljyhappo, linolihappo, palmitiinihappo tai linoleenihappo.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että homogenisointi suoritetaan sekoittamalla seos veteen, karkeaemulgoimalla se ja sitten homogenisoimalla paineatomisoimalla.

## Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en stabil fett-emulsion innehållande homogena och finfördelade partiklar och avsedd för intravenös injektion, k ä n n e t e c k n a t därav, att man homogeniserar en blandning innehållande

- a) 5-50 vikt/volym-% sojaolja,
- b) äggulafosfolipider i en viktförhållande till sojaolja av 1:4 - 1:25,
- c) 0,01 - 0,30 vikt/volym-% av en fettsyra med 12-20 kolatomer eller ett salt av denna
- d) 0,005 - 0,50 vikt/volym-% kolesterol eller kolesterolderivat,
- e) återstoden vatten och
- f) glyserol eller glukos för åstadkommande av en isoton jämnvikt tills emulsionens partiklar har en genomsnittlig diameter av högst 0,1 $\mu$ m.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att diametern av de emulgerade partiklarna är högst 1 $\mu$ m.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att mängden fettsyra eller farmaceutiskt godtagbart salt därav är 0,04 - 0,7 vikt/volym-%.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att fettsyran är sterinsyra, oleinsyra, linolsyra, palmitinsyra eller linolensyra.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att homogeniseringen utförs genom att blandningen blandas med vatten, emulgeras grovt och sedan homogeniseras genom tryckatomisering.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Saksan liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 406 621 (A 61 K 37/22).  
Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Pharmaca Fennica 1977 p. 1187.