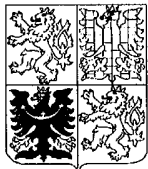


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.02.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.02.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/98103111**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/IB99/00249**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/42085**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2959

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 9/127

A 61 K 38/18

A 61 P 7/06

A 61 P 7/00

(71) Přihlašovatel:

CILAG AG INTERNATIONAL, Zug, CH;

(72) Původce:

Näff Rainer, Langwiesen, CH;

Delmenico Sandro, Schaffhausen, CH;

Wetter André, Schaffhausen, CH;

Flöther Frank-Ulrich, Schaffhausen, CH;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Erythropoietinová liposomální disperze

(57) Anotace:

Liposomální parenterální kompozice, která obsahuje: (a) účinné množství účinné přísady zahrnující erythropoetin nebo farmaceuticky vhodné deriváty s takovými biologickými vlastnostmi, které u buněk kostní dřeně vyvolávají zvýšenou produkci retikulocytů a červených krvinek; (b) lipidovou fázi zahrnující: (i) lecithin nebo hydrogenovaný lecithin; (ii) popřípadě nabitou elektropozitivní nebo elektronegativní lipidovou sloučeninu; (iii) cholesterol nebo jeho derivát zvolený z esterů cholesterolu a polvethylenglykolových derivátů cholesterolu; a (iv) alkoholickou složku zahrnující nižší alkanol s 1 až 6 atomy uhlíku; a (c) fosfátový pufr.

Erythropoetinová liposomální disperze

Oblast techniky

Vynález se týká liposomální erythropoetinové kompozice, zejména liposomální parenterální dávkovací formy erythropoetinu vyrobené způsobem se vstřikováním ethanolu, která vykazuje zlepšenou stabilitu.

Dosavadní stav techniky

Erythropoetin (EPO) je glykoprotein, který slouží jako hlavní faktor, jenž se účastní regulace syntézy červených krvinek. Erythropoetin je produkován v ledvinách a jeho účinek spočívá ve stimulaci prekursorových buněk v kostní dřeni, kdy vyvolává jejich dělení a diferenciaci na zralé červené krvinky. Po určitou dobu je již dostupný rekombinantně produkováný 165ti-aminokyselinový glykoprotein, jako terapeutické činidlo účinné při léčení různých forem anémie, jako jsou anémie spojené s chronickým selháním ledvin, anémie u HIV pacientů léčených zidovudinem a pacientů trpících rakovinou léčených chemoterapeuticky. Tento glykoprotein se podává parenterálně, a to ve formě intravenosních (IV) nebo subkutánních (SC) injekcí.

V současné době používané parenterální kompozice jsou obvyklé sterilní tlumené vodné roztoky pro IV nebo SC injekce, které obsahují lidský sérový albumin (HSA), jako nosič. Takové kompozice jsou ve Spojených státech amerických na trhu pod obchodními názvy EPOGEN^(R) a PROCRIT^(R). Tyto produkty obsahují erythropoetin v 1ml jednodávkové lahvičce bez konzervačních přísad nebo 2ml vícedávkové lahvičce s konzervačními přísadami.

Zatímto se tyto kompozice ukázaly jako velmi úspěšné, s použitím lidského sérového albuminu jako nosiče jsou spojeny určité nevýhody. Jelikož HSA pochází z přírodních zdrojů, může být potenciálně nebezpečný jako nosič infekčního agens, jako HIV nebo hepatitidy, a musí se tedy provádět pečlivý screening této látky. Kromě toho, častým problémem může být dostupnost HSA ve vhodné kvalitě. Existuje tedy potřeba vyvinout injekční kompozici na bázi erythropoetinu, která umožňuje vyloučit použití HSA jako nosiče.

Byly učiněny pokusy vyvinout zlepšenou kompozici na bázi erythropoetinu bez použití HSA jako nosiče. Tato kompozice by současně měla být stabilní a vykazovat prodlouženou dobu skladovatelnosti a neměla by vyvolávat problémy spojené s ulpíváním účinné přísady k povrchu lahvičky, v níž je obsažena.

Liposomy jsou malé vesikuly, které obsahují amfipatické lipidy uspořádané v kulovitých dvojvrstvách. Liposomy mohou obsahovat řadu soustředných lipidových dvojvrstev oddělených vodnými kanálky (multilamelární vesikuly, či MLV), nebo mohou obsahovat jedinou membránovou dvojvrstvu (unilamelární vesikuly), což mohou být malé unilamelární vesikuly (SUV) nebo velké unilamelární vesikuly (LUV). Lipidová dvojvrstva je tvořena dvěma lipidovými monovrstvami s oblastí hydrofobního "chvostíku" a hydrofilní "hlavičky". V membránové dvojvrstvě jsou hydrofobní "chvostíky" lipidové monovrstvy orientovány směrem ke středu dvojvrstvy, zatímco hydrofilní "hlavičky" jsou orientovány směrem k vodné fázi.

Liposomů lze používat pro zapouzdření různých látek tak, že se hydrofilní sloučeniny zachytí ve vodném vnitřní fázi nebo mezi dvojvrstvami, nebo se hydrofobní sloučeniny zachytí ve dvojvrstvě. Liposomy jako takové jsou zvláště

užitečné pro dodávku biologicky aktivních látek, tím, že zapouzdří sloučeniny, které vykazují špatnou rozpustnost ve vodě nebo nepříjemnou toxicitu v terapeutických dávkách.

Konkrétní způsob výroby liposomů pouze s jednou dvojitou vrstvou je popsán v EP 253 619. V průběhu let se staly známými liposomální kompozice různých účinných látek a byly také navrženy liposomální kompozice erythropoetinu. Například Maitani et al., v J. Pharm. Sci., 85: 440 až 445 (1996) popisuje liposomální erythropoetinové kompozice zamýšlené pro perorální podávání s liposomy připravenými způsobem odpaření s obrácenými fázemi. Jelikož je uvedena kompozice zamýšlená pro perorální podávání, dává se přednost vysokému procentu zavedení EPO do liposomů. Avšak kompozice, jako je výše popsáný příklad, s vysokým poměrem zapouzdření v malých vesikulách, mohou vykazovat vysokou koncentraci v játrech vedoucí k toxicitě. Kromě toho, výrobní postupy, kterých se pro jejich přípravu využívá, vyžadují speciální suroviny (například polyglycerolfosfolipid) a použití organických rozpouštědel. Při tomto způsobu s obrácenými fázemi dále dochází k vysokým ztrátám nezapouzdřeného EPO, což je nežádoucí a nákladné.

Úkolem tohoto vynálezu tedy je vyvinout parenterální kompozici vhodnou pro EPO, bez použití HSA jako nosiče, která by byla stabilní po přijatelně dlouhou dobu, což prodlouží její skladovatelnost a kterou by bylo možno vyrábět způsobem přizpůsobitelným výrobě ve velkém měřítku.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je liposomální parenterální kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje:

- (a) účinné množství účinné přísady zahrnující erythropoietin nebo jeho farmaceuticky vhodné deriváty s takovými biologickými vlastnostmi, které které u buněk kostní dřeně vyvolávají zvýšenou produkci retikulocytů a červených krvinek;
- (b) lipidovou fázi zahrnující:
 - (i) lecithin nebo hydrogenovaný lecithin;
 - (ii) popřípadě, nabitou elektropozitivní nebo nebo elektronegativní lipidovou sloučeninu; a
 - (iii) cholesterol nebo jeho derivát zvolený z esterů cholesterolu, polyethylenglykolových derivátů cholesterolu (PEG-cholesterolů) a sloučenin cholesterolů s organickými kyselinami; a
- (c) vodný tlumivý roztok (pufr).

Kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje liposomy s jedinou dvojvrstvou, které se vyrobí tak, že se připraví alkoholický roztok lipidové fáze, který se pod tlakem vstříkuje do vodného tlumivého roztoku ve vysokorychlostním homogenizéru. Takto získané liposomy se inkubují s erythropoetinovou účinnou přísadou za vzniku liposomální disperse podle vynálezu.

V přednostním provedení jsou účinnou přísadou erythropoetin a jeho deriváty s biologickými vlastnostmi, které u buněk kostní dřeně vyvolávají zvýšenou produkci retikulocytů a červených krvinek. Glykoprotein EPO je možno získat z přírodních zdrojů nebo ho vyrobit rekombinantně za použití způsobů popsanych v US patentech č. 4 703 008, 5 441 868, 5 547 933, 5 618 698 a 5 621 080, které jsou zde

citovány náhradou za přenesení celého jejich obsahu do tohoto textu.

V souvislosti s tímto vynálezem bylo zcela neočekávaně zjištěno, že liposomální EPO kompozice, připravené za zde popsaných mírných podmínek, vykazují zlepšenou stabilitu, tj. že liposomy jsou stabilní při současné minimalizaci chemického rozkladu a agregace biologicky účinné látky. Další neočekávanou výhodou je, že aktivní přísada, EPO, neulpívá na povrchu lahvičky nebo IV hadičky, a to dokonce přestože EPO v podstatě není začleněný do liposomů, ale v podstatě zůstává v intersticiální kapalině jako liposomální disperze.

Následuje podrobnější popis vynálezu.

V kompozicích podle tohoto vynálezu je účinnou složkou erythropoetin a jeho deriváty s biologickými vlastnostmi, které u buněk kostní dřeně vyvolávají zvýšenou produkci retikulocytů a červených krvinek. Liposomální disperze podle vynálezu je užitečná jako parenterální kompozice při léčení poruch krvetvorby, které se vyznačují nízkou nebo defektní tvorbou červených krvinek, jako jsou různé formy anémií, jako jsou anémie spojené s chronickým selháním ledvin, anémie u pacientů infikovaných HIV léčených zidovidinem a pacientů trpících rakovinou léčených chemoterapií. Lze ji také použít při léčení různých chorobných stavů, poruch a stavů hematologické nepravidelnosti jako jsou srpkovitost, β -talasémie, cystická fibrosa, těhotenství a menstruační poruchy, časná anémie nedonošených, poranění míchy, kosmický let, akutní krevní ztráta, stárnutí apod. Kompozice na bázi EPO podle tohoto vynálezu se přednostně podává parenterálně (například intravenózně, intramuskulárně, subkutánně nebo intraperitoneálně). Účinné dávkování bude do značné míry záviset na léčeném stavu a způsobu

podávání, avšak má se za to, že dávka účinné látky bude ležet v rozmezí od 0,1 (asi 7 U) do 100 (asi 7000 U) $\mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti. Přednostní dávka pro léčení anémie činí asi 50 až asi 300 U/kg při podávání třikrát za týden.

Liposomální disperze EPO podle vynálezu obvykle obsahuje od asi 200 000 jednotek do asi 1 milionu jednotek glykoproteinu EPO na 100 g kompozice. Účinná přísada, EPO, je dispergována v liposomální suspenzi vytvořené z

(a) lipidové fáze, která obsahuje

- (i) lecithin nebo hydrogenovaný lecithin;
- (ii) popřípadě, nabitou elektropozitivní nebo elektro-negativní lipidovou sloučeninu; a
- (iii) cholesterol nebo jeho derivát zvolený z esterů cholesterolu, polyethylenglykolových derivátů cholesterolu (PEG-cholesterolů) a sloučenin cholesterolů s organickými kyselinami; a

(b) vodného tlumivého roztoku.

Taková kompozice, zejména připravená způsobem popsaným v EP 0 253 619, který je zde citován náhradou za přenesení celého jeho obsahu do tohoto textu, vykazuje vlastnosti, které z ní činí vhodnou náhradu za kompozice podle dosavadního stavu techniky obsahující HSA.

Lecithinu se používá buď v přírodní nebo v purifikované formě nebo, přednostně, ve formě stabilnějšího hydrogenovaného lecithinu. Použití hydrogenovaného lecithinu umožní snížit koncentraci stabilizačních činidel. Lecithinová složka je obvykle přítomna v množství od asi 0,5 do asi

5,0 g na 100 g kompozice. Hydrogenovaný lecithin by přednostně měl být kvalitní, bez detegovatelné hladiny katalyzátorů, které mohou negativně ovlivnit stabilitu EPO a liposomů.

Cholesterolu se používá jako činidla pro stabilizaci liposomů v množství od asi 0,1 do asi 1,0 g na 100 g kompozice. Kromě cholesterolu se může používat jiných derivátů cholesterolu, jako jsou estery cholesterolu, polyethylenglykolové deriváty cholesteru (PEG-cholesteroly), jakož i sloučenin cholesterolů s organickými kyselinami, například hemisukcinátu cholesterolu.

Nabitým elektropozitivním nebo elektronegativním lipidem je lipidová sloučenina s kladně nebo záporně nabitou částí. Elektropozitivními lipidy jsou oleylamin nebo stearylamin. Elektronegativními lipidy jsou olejové kyseliny, fosfatidové kyseliny, jako dipalmitoylfosfatidová kyselina (DPPA), dipalmitoylglycerol (DPPG), distearoylfosfatidová kyselina (DSPA) nebo dimyristoylfosfatidová kyselina (DMPA). Za použití takových nabitých lipidů se získají nabité liposomy, které zajišťují opalescentní disperzi tím, že zabráňují sedimentaci liposomů. Jak již bylo uvedeno výše, zcela neočekávaným výsledkem je, že aktivní glykoprotein erythropoetin neulpívá na stěnách skleněné lahvičky nebo silikonové hadičky použité pro podávání, přestože aktivní přísada není začleněna do liposomů, nýbrž existuje pouze ve formě disperze s nabitými liposomy.

Alkoholická složka zahrnující nižší alkanol s 1 až 6 atomy uhlíku, jako methanol, ethanol, n-propanol, isopropylalkohol, n-butanol apod., v množství od 0,5 do asi 5,0 g na 100 g kompozice, je obvykle přítomna v kompozici připravené za použití způsobu se vstřikováním ethanolického roztoku. Ethanolu se dává přednost.

Vodná tlumivá složka je zvolena z běžných solí kyselin, kterých se obvykle používá jako pufrů v parenterálních kompozicích. Jako příklady této složky je možno uvést citrany, octany a fosforečnany. Fosfátovému pufru se dává přednost. Jako příklady lze uvést dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného nebo dihydrát hydrogenfosforečnanu dvojsodného a jejich směsi. Přednost se dává směsi dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného a dihydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného v množství od 0 do 2,0 g/100 g.

Za účelem zabránění tvorbě agregátů je do kompozice popřípadě možno přidat stabilizátor, jako glycin. V mnoha případech však takové stabilizátory nejsou nutné, jelikož liposomy v kompozici účinkují jako stabilizátor i jako nosič.

Liposomální kompozice podle vynálezu se vyrábí za použití způsobů, které jsou v oboru přípravy liposomálních kompozic známy a jsou popsány v EP 0 253 619. Při tomto způsobu se vyrobí liposomy s jedinou dvojvrstvou tak, že se připraví ethanolický roztok fosfolipidu a aktivní přísady a tento roztok se pod tlakem vstříkne do vodného tlumivého roztoku ve vysokorychlostním homogenizéru. Liposomy se vytvoří spontánně a mají průměr méně než 1 μm . Konkrétně se způsobem podle vynálezu liposomy vyrábějí tak, že se připraví vodný tlumivý roztok v purifikované vodě. Lecithin, cholesterol a nabitá lipidová složka se odděleně rozpustí v alkoholickém roztoku, jako ethanolu. Vodný roztok se zavede do vysoce účinného homogenizéru, aby se dosáhlo cirkulace a alkoholický roztok se přímo vstříkuje do homogenizéru. Spontánně vzniknou liposomy menší než 1 μm . Takto získané liposomy se poté inkubují s účinnou přísadou, EPO, za vzniku liposomální disperze podle vynálezu.

Transparentní liposomální disperze s dobře vymezeným průměrem liposomů se získá tak, že se liposomy

přednostně protlačí filtry s velikostí pórů asi 0,05 až 0,08 mm, což vede k liposomům s průměrem asi 80 až 100 nm. Tento přídatný třídící stupeň se zařazuje, aby se zajistila transparentnost roztoku, ve kterém lze snadno zjistit přítomnost agregátů, a za účelem prodloužení doby cirkulace v krvi.

Jak již bylo uvedeno výše, erythropoetinové kompozice, které jsou v současné době na trhu mají omezenou skladovatelnost a pro udržení stability obsahují stabilizátory, jako látky typu Tween, aminokyseliny atd., nebo se skladují lyofilizované. Zjistilo se, že liposomální kompozice podle tohoto vynálezu vykazuje vynikající stabilitu, tj. že liposomy samotné jsou stabilní a současně jsou minimalizovány rozklad a agregace biologicky účinné látky. Bylo dosaženo až dvouleté skladovatelnosti, což je velmi důležité pro průmyslové využití. Tuto zlepšenou stabilitu lze připsat ohleduplnějšímu způsobu výroby podle vynálezu a lepším přísadám a složení kompozice (jak z kvalitativního, tak kvantitativního hlediska ve srovnání s kompozicemi popsány v literatuře).

Stabilitu kompozice je možno dále zvýšit přidavkem antioxidantů, jako je tokoferol, butylovaný hydroxytoluen, butylovaný hydroxylanisol, askorbylpalmitát, nebo edetátů, jako je edetát dvojsodný, s edetáty, které navíc vážou případně přítomné těžké kovy. Stabilitu lze ještě zvýšit přidavkem konzervačních činidel, jako jsou kyselina benzoová a parabeny, například methylparaben a/nebo propylparaben.

Přednostní kompozice má následující složení:

	na 100 g
EPO nebo analogické sloučeniny	200 000 až 4 miliony U
Hydrogenovaný lecithin (sojový)	0,5 až 5,000 g

Cholesterol	0,1 až 1,000 g
Nabitý lipid	0,05 až 0,5 g
Ethanol	0,5 až 5,000 g
Glycin	0,0 až 1,00 g
Pufr	0 až 2,0 g
Další případné přídavné látky a voda	q.s. do 100,0 g

Konkrétní výhody tohoto vynálezu jsou ilustrovány v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Liposomální disperze

Způsobem popsaným v EP 0 253 619 se vyrobí liposomální disperze o následujícím složení:

	na 100 g
Erythropoetin	1 milion IU
Hydrogenovaný lecithin (sojový)	0,500 g
Cholesterol	0,100 g
Farmaceutický nedenaturovaný ethanol	0,500 g
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	0,1164 g
Dihydrát hydrogenfosforečnanu dvojsodného	0,2225 g
Chlorid sodný	0,584 g
Purifikovaná voda	97,9771 g

Způsob:

Liposomy se získají tak, že se při 80°C připraví vodný roztok elektrolytu (pufr) z dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, dihydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného a chloridu sodného ve vodě pro injekce. Odděleně se lecithin

a cholesterol při 55 až 70°C rozpustí v alkoholickém roztoku, jako ethanolu. Vodný roztok se uvede do vysoce výkonného homogenizéru pro zajištění cirkulace (nádobu 1) a alkoholický roztok (nádobu 2) se přímo vstříkuje do homogenizéru. Ethanolickým roztokem se během celého postupu nechá procházet dusík. Spontánně vzniknou liposomy o průměru méně než 1 μm . Liposomy s dobře vymezeným průměrem se získají tak, že se liposomální disperze nechá projít filtry Nucleopore s definovanou velikostí pórů (například 0,8 a 0,5 μm). Erythropoetin se inkubuje s liposomální disperzí a poté podrobí jedné sterilní filtraci. Lahvičky se plní za aseptických podmínek.

Technické údaje:

Frekvence otáčení homogenizéru: 13 000 min^{-1}

Průtok ethanolického roztoku: 20 až 100 ml/s

P ř í k l a d 2

Liposomální disperze

Složení:

	na 100 g
Erythropoetin	1 milion IU
Hydrogenovaný lecithin (sojový)	0,500 g
Cholesterol	0,100 g
Sodná sůl DPPA	0,040 g
Farmaceutický nedenaturovaný ethanol	0,500 g
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	0,1164 g
Dihydrát hydrogenfosforečnanu dvojsodného	0,2225 g
Chlorid sodný	0,584 g
Purifikovaná voda	97,9371 g

Způsob:

Výše popsaná liposomální disperze se připraví způsobem popsaným v příkladu 1 s tím rozdílem, že se před vstříkáním k ethanolickému roztoku kromě lecithinu a cholesterolu přidá sodná sůl DPPA.

P ř í k l a d 3

Liposomální disperze

Složení:

	na 100 g
Erythropoetin	1 milion IU
Hydrogenovaný lecithin (sojový)	0,500 g
Cholesterol	0,100 g
Sodná sůl DPPG	0,050 g
Farmaceutický nedenaturovaný ethanol	0,500 g
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	0,1164 g
Dihydrát hydrogenfosforečnanu dvojsodného	0,2225 g
Chlorid sodný	0,584 g
Purifikovaná voda	97,9271 g

Způsob:

Výše popsaná liposomální disperze se připraví způsobem popsaným v příkladu 2.

P ř í k l a d 4

Zkoušení stability

Podle příkladů 1 a 2 se připraví dvě várky liposomální erythropoetinové kompozice. Várky se zkouší na stabi-

litu v různých časových intervalech. Postupy pro biostanovení in vitro a in vivo jsou popsány dále a jejich výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

T a b u l k a 1

Produkt: Erythropoetinová liposomální kompozice z příkladu 1

BN: nenabité liposomy

Dávka: 10 000 IU/ml

Doba skladování	Podmínky skladová- ní (°C)	Vzhled	pH	Identita EPO	ELISA	Biosta- novení
Počátek	NA	vyhovuje	6,86	vyhovuje	9695	NA
3	2 - 8	vyhovuje	6,97	vyhovuje	9194	NA
3	25	vyhovuje	6,98	vyhovuje	8715	NA
6	2 - 8	vyhovuje	7,07	vyhovuje	9925	NA
6	25	vyhovuje	7,08	vyhovuje	7886	NA
9	2 - 8	vyhovuje	7,01	vyhovuje	9452	NA
12	2 - 8	vyhovuje	7,02	vyhovuje	9452	NA
18	2 - 8	NA	NA	vyhovuje*	8635	NA
24	2 - 8	vyhovuje	7,05	vyhovuje	9200	8900**

* < 2% agregační standard (2%-AGG-1") podle densitometrie

** in vivo biostanovení na myši

T a b u l k a 2

Produkt: Erythropoetinová liposomální kompozice

BN: negativně nabitě liposomy (Na-DPPA)

Dávka: 10 000 IU/ml

Doba skladování	Podmínky skladová- ní (°C)	Vzhled	pH	Identita EPO	ELISA	Biosta- novení
Počátek	NA	vyhovuje	6,71	vyhovuje	8757	10120
3	2 - 8	vyhovuje	7,03	vyhovuje	8776	8020
3	25	vyhovuje	7,02	vyhovuje	7854	NA
6	2 - 8	vyhovuje	7,02	vyhovuje	9621	7710
6	25	vyhovuje	7,06	vyhovuje	8453	NA
9	2 - 8	vyhovuje	7,03	vyhovuje	9189	8870
12	2 - 8	vyhovuje	NA	vyhovuje*	9150	NA
18	2 - 8	vyhovuje	6,99	vyhovuje	9003	9500**
24	2 - 8					NA

* <2% agregační standard (2%-AGG-1") pomocí densitometrie

** in vivo biostanovení na myši, ostatní jsou biostanovení in vitro

Biostanovení in vivo

Biostanovení erythropoetinu na exhypoxických polycythemických myších

Myši se 18 hodin ponechají za sníženého tlaku a poté 6 hodin za okolního tlaku. Tento postup se následujících 14 dní opakuje. Po 3 dnech pobytu za okolního tlaku se myším podá erythropoetin a po 1 dni injekčně $^{59}\text{FeCl}_3$. Po dalších 2 dnech se analyzují krevní vzorky a stanoví se začlenění $^{59}\text{FeCl}_3$ do erythrocytů.

Biostanovení in vitro

Biostanovením in vitro je buněčné biostanovení navržené pro přesnou kvantifikaci biologické aktivity epoetinu alfa.

Vzorky se nejprve zředí v médiu pro kultivaci tkání a poté smísí s buněčnými kulturami HEP.G2. Tato adherentní buněčná linie udržuje kapacitu hepatické tkáně, pokud se týče její schopnosti odstraňovat desialované proteiny. Je známo, že k podobnému metabolickému pochodu dochází in vivo, což vede ke snížené aktivitě desialovaného erythropoetinu. Po ošetření buňkami HEP.G2 nebude docházet k odstraňování sialovaného erythropoetinu v epoetinu alfa z média. Biostanovení in vitro tedy napodobuje zkoušku in vivo na myši.

Ve druhém stupni se zbývající erythropoetin oddělí od buněk HEP.G2 a podrobí zkoušce buněčné proliferace za použití buněčné linie B6SUtA. Tyto buňky rostou za přítomnosti erythropoetinu a rozsah růstu je přímo úměrný množství erythropoetinu. Následně se změří buněčný růst jako intenzita zbarvení produkovaného po přidání MTT k buňkám. Zbarvení je přímo úměrné počtu buněk a snížení aktivity buněk B6SUtA.

Závěr:

Výše uvedené údaje demonstrují dobrou stabilitu obou kompozic po dobu až 24 měsíců.

29.03.01

2000-2959

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Liposomální parenterální kompozice, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že obsahuje:

(a) účinné množství účinné přísady zahrnující erythropoietin
nebo jeho farmaceuticky vhodné deriváty s takovými bio-
logickými vlastnostmi, které které u buněk kostní dřeně
vyvolávají zvýšenou produkci retikulocytů a červených
krvinek;

(b) lipidovou fázi zahrnující:

(i) lecithin nebo hydrogenovaný lecithin;

(ii) popřípadě nabitou elektropozitivní nebo elektro-
negativní lipidovou sloučeninu;

(iii) cholesterol nebo jeho derivát zvolený z esterů
cholesterolu a polyethylenglykolových derivátů
cholesterolu; a

(iv) alkoholickou složku zahrnující nižší alkanol
s 1 až 6 atomy uhlíku; a

(c) fosfátový pufr.

2. Liposomální kompozice podle nároku 1, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje liposomy s
jedinou dvojvrstvou vyrobené tak, že se připraví roztok
lipidové fáze v alkoholickém rozpouštědle, který se pod
tlakem vstříkne do vodného tlumivého roztoku obsaženého ve
vysokorychlostním homogenizéru.

3. Liposomální kompozice podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje stabilizátor.

4. Liposomální kompozice podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stabilizátorem je glycin.

5. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že lecithinem je hydrogenovaný lecithin.

6. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že alkoholickou složkou je ethanol.

7. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nabitá elektropozitivní nebo elektronegativní lipidová sloučenina je zvolena z dipalmitoylfosfatidové kyseliny (DPPA), dipalmitoylglycerolu (DPPG), oleylaminu a stearylaminu.

8. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pufr je zvolen z dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, dihydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného a jejich směsí.

9. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje konzervační činidlo.

10. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje antioxidant.

29.03.01

11. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje komplexotvorné činidlo.

12. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že má následující složení

na 100 g

EPO nebo analogické sloučeniny	200 000 až 1 milion jednotek
hydrogenovaný lecithin (sojový)	0,5 až 5,000 g
cholesterol	0,1 až 1,000 g
nabitý lipid	0,05 až 0,5 g
ethanol	0,5 až 5,000 g
glycin	0,0 až 1,00 g
pufr	0 až 2,0 g
další případné přídavné látky a voda	q.s. do 100,0 g.

13. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 a 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že má následující složení

na 100 g

erythropoetin	1 milion IU
hydrogenovaný lecithin (sojový)	0,500 g
cholesterol	0,100 g
sodná sůl DPPA	0,040 g
farmaceutický nedenaturovaný ethanol	0,500 g
dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	0,1164 g
dihydrát hydrogenfosforečnanu dvojsodného	0,2225 g
chlorid sodný	0,584 g
purifikovaná voda	97,9371 g.

29.03.01

14. Liposomální kompozice podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13 pro použití jako farmaceutický přípravek pro léčení anémie.