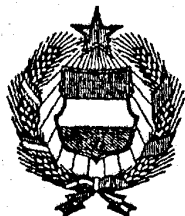


(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(11) (13)

196230B

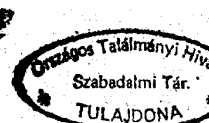
Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄
C 08 B 37/16
C 07 D 313/00
A 61 K 31/715
A 61 K 31/365
A 01 N 43/02

(21) (4508/83)

(22) A bejelentés napja: 83. 12. 29.

(41) (42) Közzététel napja: 85. 06. 28.

(45) A leírás megjelent: 89. 12. 12.



Feltaláló(k): (72)

dr. SZEJTLI JÓZSEF 24 %, dr. STADLER ISTVÁNNÉ 21 %,
dr. VIKMON Andrásné 21 %, PIUKOVICH Sándor 7 %, INCZEFI
István 6 %, dr. KULCSÁR Gábor 8 %, dr. JÁRAI Miklós 6 %,
Budapest, dr. ZLATOS Gabriella 7 %, Szentendre, HU

Szabadalmas: (73)

CHINOIN Gyógyszer és Vegyészeti Termé-
kek Gyára Rt., Budapest, HU

(54)

ELJÁRÁS POLIÉN ANTIBIOTIKUMOK VÍZOLDHATÓ FORMÁINAK ÉS ILYEN HATÓANYAGOT TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ÉS ANTIFUNGÁLIS HATÁSÚ NÖVÉNYVÉDŐSZER ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás a polién antibiotikumok körébe tartozó tetraén, pentaén, hexaén, heptaén antibiotikumok gamma-ciklodextrinnel képezett új, vízoldható és stabilis zárványkomplexének előállítására, oly módon, hogy valamely, vízben korlátozottan oldódó, ill. gyakorlatilag oldhatatlan,

a polién antibiotikumok körébe tartozó tetraén, pentaén, hexaén, heptaén antibiotikumot gamma-ciklodextrinnel reagáltatunk, víz és kívánt esetben vízzel elegyedő szerves oldószer jelenlétében, keverés vagy gyúrás közben, majd a kapott antibiotikum-gamma-ciklodextrin zárványkomplexet izoláljuk.

Találmányunk tárgyát új, vízdoldható és stabilis polién antibiotikum-származékok előállítására szolgáló eljárás képezi. A bakteriális fertőzéseknek az antibiotikumokkal történő sikeres visszaszorítása megnövelte a fungális fertőzések számát, ez pedig előtérbe helyezte az antifungális készítmények problémáját. Részben az antibiotikumos kezelések következtében, részben pl. orális fogamzásgátlók szedésének következtében egyre fokozódik a gombás fertőzések elterjedése. Különösen trópusi és szubtrópusi országokban jelentenek nagyon komoly problémát a gombás fertőzések.

Az egyre jobban terjedő gombás fertőzések gyógyítását megnehezíti az a tény, hogy lényegesen kevesebb antifungális anyaggal rendelkezünk, mint antibakteriális anyaggal. A polién antibiotikumokat jelentős antifungális hatásuk miatt széleskörben alkalmazzák szisztémikus és nem szisztémikus mikózisok kezelésére. Eddig mintegy száz polién antibiotikumot írtak le az irodalomban, de a gyakorlatban ezek közül csak keveset alkalmaznak.

A polién antibiotikumok a makrolid antibiotikumok közé tartoznak. Szerkezetükre jellemző, hogy makrolid lakton gyűrűt tartalmaznak, ahol a szénatomok száma 25—37 lehet. A gyűrű egyik oldalán nagy számú OH-csoport helyezkedik el, számuk 3—8 között változik, a gyűrűnek ez a része poláros, viszonylag hidrophil tulajdonságú. A gyűrű másik oldalán konjugált kettőskötések vannak, a kettőskötések száma 3—7, a gyűrűnek ez a része apoláros, hidrofób tulajdonságú. Az összes kettőskötés transz konfigurációjú. A makrolid gyűrű amino cukorrészt (általában mikózamint) és karboxil-csoportot is tartalmazhat, e két csoport jelenléte miatt amfotér tulajdonságú. Némely esetben aromás oldallánc is található a gyűrűn, pl. candicidin.

Ezek a jellemző szerkezeti tulajdonságok megmagyarázzák a fizikai és kémiai tulajdonságokat.

A konjugált kettőskötések jelenléte következtében a gyűrűben erős kromofor rendszer alakul ki, melynek bármilyen megváltozása a hatás elvesztését eredményezheti. Jellemző a polién kromoforokra, hogy érzékenyek hővel, UV sugárzással, extrém pH-értékkel, és különösképpen oxigénnel szemben.

A poliének szerves oldószerekben jól definiált UV abszorpciós maximummal jellemezhetők, ami a molekula sokszorosan konjugált telítettségével van kapcsolatban. Az UV maximum helye, a konjugált kettőskötések száma és a polién színe között összefüggés mutatható ki. A polién antibiotikum-csoport felosztása alcsoportokra a kettőskötések száma szerint történik, vagyis az UV tartományban észlelt maximumok helye alapján. A triének 3, a tetraének 4, a pentaének 5, a hexaének 6, a heptaének pedig 7 kettőskötést tartalmaznak a kromofor rendszerben. Lineáris az összefüggés az UV tartományban észlelhető 3 éles abszorpciós maximum helye és a kromoforban lévő konjugált kettőskötések száma között, a poliének színe pedig ettől függ. A triének színtelen, a tetraének sápadt sárga, a pentaének sárga, a hexaének sárgás-narancs, a heptaének narancs színűek.

Triének atipikus, nem túl jelentős csoport. Tulajdonságaikban inkább a makrolid antibiotikumok másik csoportjához, a nem-polién makrolid

antibiotikumokhoz (pl. erithromycin) hasonlítanak.

Tetraének: fontos képviselője a nisztatin, molekulájában 6 kettőskötést tartalmaz ugyan, így a hexan-csoportba tartozik, de mivel csak 4 kettőskötés van konjugált helyzetben, a másik 2 kettőskötést pedig metilén-híd választja el a többi 4 kettőskötéstől, emiatt tetraénként viselkedik, pl. a tetraénekre jellemző UV-spektruma van.

Ide tartozik még: pimaricin, stb.

Pentaének: fontos képviselőjük a flavofungin, mely laktón-csoporttal konjugált karbonil polién. Szerkezete jól felismerhető a módosult UV-spektrumról, mely csak egy kiszélesedett csúcsot tartalmaz.

Ide tartozik még: filipin, fungikromin-lagosin stb.

Hexaének: nem jelentősek, ide tartozik: candi-hexin

Heptaének: két, klinikailag is nagyon fontos tagja van: amphotericin B, candicidin.

A további csoportosítás aszerint történik, hogy tartalmaznak-e aromás-oldalláncot, vagy sem: 1. klasszikus heptaének, nem tartalmaznak aromás részt, pl. amphotericin B, candidin. 2. aromás részt tartalmazó heptaének, p-amino-acetofenont tartalmaznak: ascocin, candicidin, N-metil-p-amino-acetofenont tartalmaz: perimicin.

A poliének oldhatósági viselkedése a szerkezetükből következik, mivel a makrolid gyűrű egyik oldalán hidrophil, a másik oldalán pedig hidrophób csoportokat tartalmaz. A kettőskötések számának a növekedésével a kromofor hidrophób jellege növekszik, s így csökken az oldhatóság. A gyakorlati szempontból jelentős polién antibiotikumok vízben gyakorlatilag oldhatatlanok. Orálisan adagolva alig vagy egyáltalán nem szívódnak fel, ezért per os toxicitásuk elenyésző. Parenterális alkalmazás esetén, különösen intravénás alkalmazásnál azonban az LD₅₀ érték néhány mg/testtömeg kg. (A poliének definícióját és jellemzését tartalmazó irodalom: S. M. Hammond: Biological Activity of Polyene Antibiotics, Progress in Medicinal Chemistry, Vol. 14, North-Holland Publishing Company, 1977, p. 105.)

A polién antibiotikumok felhasználásra kerülnek még a szövettenyészetekben a gombák távol-tartására, élelmiszeriparban és a mezőgazdaságban a növényi gombakártevők ellen. Az ilyen irányú alkalmazhatóságoknak határt szab a vízben való nagyfokú oldhatatlanságuk, illetve a vizes diszperz rendszerekben mutatott nagyfokú instabilitásuk.

A polién antibiotikumok elsősorban más, széles körben elterjedt fungicidekkel kombinálva kerülhetnek alkalmazásra, amelyekkel szemben azonban már jelentős mértékben kialakult a rezisztencia. Ezért nem csupán a vízdékonyság növelését, illetve a vizes oldatban mutatott stabilitás fokozását kell megoldania a polién antibiotikumok alkalmazható formulázásának, hanem azt a problémát is, hogy ezek kompatibilisek legyenek, nedvesíthető por formulátumokban, más hatóanyagokkal kombinálva.

A polién antibiotikumok poláros szerves oldószerekben (pl. dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid, etanol stb.) oldhatók. Ha ezeket az oldatokat vízzel hígítjuk, az oldott antibiotikumok nem

csapódnak ki az oldatból, de nem valódi oldatok képződnek, hanem nem-dializálható micellákból álló instabilis állapot jön létre.

(J. Kirschbaum: J. Pharm. Sci., 63, 1974, 1981). Ilyen micelláris diszperzióban a hidrofób részek csatlakoznak egymáshoz, ez bizonyos fokú védettséget jelent a polién kromoforok számára.

Ha a vízdékonyságot növelik, akkor általában csökken a molekula kémiai stabilitása. Pl. azonos körülmények között tárolva a száraz Amphotericin B, és metilésztere azonos stabilitást mutat. Vizes közegben azonban az Amphotericin B metilésztere lényegesen labilisabb mint az eredeti molekula, mivel a metilészter vizes közegben jobban diszpergálódik, így kevésbé védett a polién kromofor-csoport. (Bonner: J. Antibiot., 28, 1975, 132).

A polién antibiotikumok oldható komplexeit előállították nátrium-dezoxikoláttal, vagy nátrium-laurilszulfáttal (detergens típusú anyagok) illetve Na-boráttal; ezek azonban minden esetben kolloidális diszperziók csupán. Koprecipitátumok előállításával is növelhető valamelyest az oldékonyság; pl. Nisztatin-t polivinil-pirrolidonnal együtt kicsapva 8—10-szeresére növekszik a Nisztatin oldékonysága, de a stabilitása ekkor is erősen csökken. (M. B. Dexter: J. Pharm. Pharmacol., 27, 1975, 58 P).

A vízben való oldhatatlanság és a vizes diszperz-rendszerekben tapasztalt instabilitás miatt eddig gondolni sem lehetett polién antibiotikumok olyan alkalmazásaira, ahol stabilis vizes oldatokra van szükség; azaz injektábilis, vagy lokálisan alkalmazható (szemcsepp, fülcsepp, stb.) oldatokban és növényvédelmi célokat szolgáló permetező szerekben. Ezideig polién antibiotikum oldatokat még nem állítottak elő, csak vizes szuszpenziókat, pl 10—30 000 E/ml finoman porított nisztatin tartalmú szemcseppet (Martindale: The Extra Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, London, 1977, P. 649.)

Az irodalomban közölt adatokból az állapítható meg, hogy a polién antibiotikumok vízdékonyságának a növelése minden eddigi esetben csökkentette azok kémiai stabilitását.

Kísérleteink során nem várt módon azt találtuk, hogy jelentősen megnő a polién antibiotikumok oldékonysága (60-80-szorosára) és ugyanakkor kémiai és biológiai stabilitása egyaránt megmarad, ha gamma-ciklodextrin (a továbbiakban gamma-CD) komplexét állítjuk elő.

Az irodalomban számos példát írtak le eddig különböző anyagok oldékonyságának a fokozására alfa- és béta-ciklodextrinnel, (J. Szejtli: Cyclodextrins and their inclusion complexes, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982) gamma-ciklodextrinről azonban nagyon kevés adat található.

Kísérleteink szerint alfa- és béta-CD-vel sem számottevő oldékonyság fokozódást, sem stabilitás növekedést nem lehet elérni a polién antibiotikumoknál.

A számos ismert polién antibiotikum közül részletesebben a flavofungint, a nisztatint és amphotericin B-t vizsgáltuk meg.

A flavofungint a Streptomyces flavofungini termeli. Élénk sárga színű kristályos anyag, olvadáspontja: 210 °C. Két komponens 10:1 arányú elegye, melyek összegképlete: $C_{36}H_{58}O_{10}$ illetve $C_{37}H_{60}$

O_{10} . Nagyon széles antifungális spektrummal rendelkezik. Hatástani és toxikológiai vizsgálatait megnehezíti az a tény, hogy vízben gyakorlatilag oldhatatlan, levegőn állva bomlik, veszt a biológiai hatásából. Pl. szobahőmérsékleten levegőn állva két héten belül elveszíti aktivitásának 50%-át. Nitrogén vagy széndioxid atmoszférában bomlás nélkül tárolható. Alkalmazásra ezért ezideig nem is került sor. (Uri et al: Austrian Patent 215 076).

A flavofungin oldékonyságának és stabilitásának javítása céljából megkíséreltük háromféle módon is a béta-CD komplexének előállítását. Először is feloldottunk 121 mg flavofungint 1,5 ml kloroformban és ezt metanollal 10 ml-re egészítettük ki. Ezúton feloldottunk 1,8 g béta-ciklodextrint (száritási vesztesége 13%) 28 ml desztillált vízben 60 °C-on, majd nitrogén áram alatt ehhez állandó keverés közben lassan hozzácepegtettük az említett flavofungin oldatot. Az oldat először zavaros lett, majd kb. 5 perc múlva teljesen kitisztult. Fél óras keverés után lassan lehűtöttük, majd megfagyasztottuk és liofilizáltuk. A termékben a béta-ciklodextrin és a flavofungin molaránya 1:0,53 volt. Másodszor előállítottuk a 1:0,4 molarányú terméket is a fentiekben leírt módon, de 40 °C-on. Harmadszor egy másik kísérletben liofilezés nélkül, csak 12 órán át 0 °C-on tároljuk az oldatot, tehát kristályosítással izoláljuk a terméket. Ez esetben a kristályos termékben 7,9% flavofungin volt található.

Az izolált terméket oldva ugyanolyan ultraibolya abszorpciós görbét eredményeztek, mint a tiszta flavofungin. 1 hónapig szobahőmérsékleten, fénytől elzárva tárolva azonban igen jelentős mértékű spektrumváltozás történt. A 360 nm körüli extinkció jelentős mértékben csökkent, ugyanakkor a 260 nm-nél nőtt az abszorpció.

250 órán át 32 °C-on tisztá oxigénben tartva a flavofungint, illetve az említett módon előállított béta-ciklodextrin komplexeket, a komplexált hatóanyag oxigén felvétele a tiszta hatóanyagénak kb. 30%-a volt. Tehát a béta-ciklodextrin csak részben tudja védeni a flavofungint az oxidációtól. Az említett körülmények között az oxigén hatása abban is megnyilvánult, hogy a 360 nm-nél megfigyelhető max. teljesen elűnt, és az egész abszorpciós spektrum képe megváltozott.

A flavofungin béta-ciklodextrin komplexe a mikrobiológiai vizsgálatok során gombákkal szemben teljesen hatástalannak bizonyult.

Megállapítható tehát, hogy a béta-ciklodextrin és a flavofungin között kölcsönhatás létrejön ugyan — mert a vízben nem oldható flavofungin a béta-ciklodextrin oldatában teljesen tiszta, átlátszó oldatot eredményez —, de valószínűleg a molekulának legkényesebb részeit a béta-ciklodextrin nem zárja magába, ezért nem sikerült megoldanunk a stabilis, és biológiailag aktív flavofungin-béta-ciklodextrin zárványkomplex előállítását.

A polién antibiotikumok és a gamma-ciklodextrin között — a gyakorlati alkalmazás szempontjából alapvetően kedvezőbb kölcsönhatásokat figyeltünk meg.

A flavofungin gamma-ciklodextrin kölcsönhatás első bizonyítéka a flavofungin oldékonyságának igen nagymértékű növekedése a vizes gamma-ciklodextrin oldatokban.

Az oldékonyság vizsgálatokor különböző koncentrációjú vizes gamma-CD oldatokat állítottunk elő: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 7,5 és 10%-os oldatokat, ezek minden ml-éhez 5 mg szilárd flavofungint adagoltunk, majd 25 °C-on 3 órán át intenzíven rázattuk az így készített oldatokat.

Az oldatot tisztára szűrve, spektrofotometriásan meghatároztuk az oldatba ment flavofungin mennyiségét. A mérések eredménye azt mutatja, hogy a flavofungin oldékonysága a legnagyobb a 4%-os gamma-CD vizes oldatban, ahol is mintegy 4 mg/ml flavofungin-koncentráció érhető el a vizsgálat körülményei között. Mivel a flavofungin eredeti koncentrációja vizes oldatban mindössze 0,05 mg/ml, ez körülbelül 80-szoros oldékonyságfokozásnak felel meg. A gamma-CD koncentráció további növelésével a flavofungin oldékonysága már nem fokozódik.

Az oldékonyság vizsgálat eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A 25 °C-on mért oldékonysági izoterma kezdeti lineáris szakaszából számított látszólagos komplex-stabilitási-állandó értéke ~ 3230.

A 4%-os γ -CD oldatban talált maximális oldhatóságot különböző hőmérsékleten is megvizsgáltuk.

Ezen értékek a következők:

10 °C-on: 3,3

30 °C-on: 4,1

40 °C-on: 3,8 mg/ml flavofungin koncentráció.

1. táblázat

A flavofungin oldékonysága a gamma-ciklodextrin koncentráció függvényében (25 °C, 3 óras rázatás)

γ -ciklodextrin koncentráció (%)	Flavofungin koncentráció mg/ml
0	0,05
1	1,0
2	1,8
3	3,0
4	4,0—4,2
5	3,8
7,5	3,7
10	3,8

A nisztatin a *Streptomyces noursei*, *S. albulus*, vagy *S. aureus* törzs által fermentációval a legnagyobb mennyiségben előállított polién macrolid antibiotikum. A kereskedelemben kapható nisztatin nem egységes, kémiaiilag közelálló A₁, A₂, A₃-mal jelzett komponensek elegye (Sherin et al.: Antibiotiki 13, 987 (1968)). Éppen ezért nehéz a szigorúan tiszta anyag izolálása és kielégítő analitikai jellemzése; az anyag eredetétől, tisztaságától, egységességétől függően a fizikai-kémiai tulajdonságok széles skáláját kapjuk.

Szobahőmérsékleten vízben és nem-poláros oldószerekben gyakorlatilag oldhatatlan, jól oldódik viszont formamidban, dimetilformamidban, dimetilszulfoxidban, piridinben, etilén-glikolban és propilén-glikolban. Az oldhatóság poláros oldószerekben 10—20% víz jelenlétében jelentősen megnövekszik. Pl. 4 mg/ml-es az oldhatóság 75%-os etanolban (szemben a 0,55 mg/ml-rel tiszta etanol-

ban), 2,2 mg/ml 70% vizes izo-propil-alkoholban (0,62 mg/ml tiszta izo-propil-alkoholban) (Trakhtenberg et al.: Antibiotiki 5 9 (1960); Analytical profiles of drug substances. Vol. 6. Academic Press, New York and London, 1977. p. 344.)

Metanolban mért maximális oldhatóság: 9,2—11,2 mg/ml (Weiss et al.: Antibiot. Chemotherapy. 7, 374 (1957)). A nisztatin széles körben a legnagyobb mennyiségben topikálisan alkalmazott antibiotikum a bőr, a köröm, a nyálkahártya monília fertőzésére. Gyomor-, béltraktus candidiazis gyógyítására per os alkalmazzák, de hatástalan a systemás mycosis kezelésére, mivel az orálisan adagolt nisztatin egyáltalán nem szívódik fel. (Vérszint egyáltalán nem mérhető).

A flavofunginhoz hasonlóan a nisztatinnál is vizsgáltuk az oldékonyság változását gamma-CD oldatokban. A vizsgálatokhoz 0; 1; 2,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 és 15%-os vizes gamma-CD oldatokat készítettünk, az oldatokba 20 mg/ml nisztatint adagoltunk, majd 37 °C-on történő 10 perces rázatás után mértük az oldatok nisztatin-tartalmát spektrofotometrikus módszerrel. A méréseknel a flavofunginhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a vizes gamma-CD oldatokban megnő a nisztatin oldékonysága, az 5%-os gamma-CD oldatban mintegy 25-szöröse, a 10%-os gamma-CD oldatban pedig mintegy 40-szerese a tiszta vízben mért oldékonyságnak. A mérési eredményeinket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat

A nisztatin (biológiai aktivitása 5033 E/mg) oldékonysága a gamma-ciklodextrin koncentráció függvényében. (37 °C, 10 perces rázatás)

γ -CD koncentráció (%)	Nisztatin koncentráció mg/ml
0	0,20
1	1,30
2,5	2,36
4	3,95
5	4,70
6	5,50
7	6,30
8	7,20
9	8,10
10	8,95
15	8,20

A 37 °C-on mért oldékonysági izoterma kezdeti lineáris szakaszából számított látszólagos komplex-stabilitási állandó értéke ~ 500.

Az *Amphotericin B* a *Streptomyces nodosus* által termelt polién antibiotikum. Hatásspektruma széles, élesztőgombák, gombák kivételével számos protozoára is hat. A legelterjedtebben használt az akut systemikus gombafertőzések kezelésére. Adható orálisan és intravénás infúzióban néhány órán keresztül. Intravénásan a nátriumdeozoxikolat komplexét alkalmazzák (Fungizone márkanéven). Az epesavas sókkal képezett komplexek alkalmazása intravénásan viszont hányingert, anaémiát, lázt, vesekárosodást okozhat, mivel az epesavas sókkal

alkotott komplexek — bár vízdékonyságuk jobb, — sokkal toxikusabbak, mint az egyéb származékok. Például az Amphotericin B metil-észterének toxicitása egereken, intra peritoneálisan $LD_{50} = 1320$ mg/kg, a nátriumdezoikolat komplexének toxicitása ugyanígy mérve $LD_{50} = 280$ mg/kg. A dezoikolat komplex megnövekedett toxicitását nagy valószínűséggel az epesavas só jelenléte okozza. (Thomas: *The Analyst*. 101, 321, 1976.)

Orális alkalmazás esetén alacsony vérszint értékek mérhetők, így alkalmas a systemikus mycosis per os kezelésére. A paranterális alkalmazásra ajánlott Amphotericin B tartalmú készítmények azonban nem valódi oldatok. Ezt bizonyítja az UV-spektrumok koncentráció függése is.

Az Amphotericin B nagyon jellegzetes UV-spektruma, ami a heptaén kromofor-csoportnak tulajdonítható, megváltozik vizes oldatban. 408, 385, 366, ill. 347 nm-nél abszorpciós maximummal rendelkezik, csökkenő csúcsmagassággal és hullámhossz csökkenésével, ez jellemző a monomerre közelítőleg 4 -g/ml koncentrációban. A magasabb koncentrációnál a 347—408 nm közti maximumok fokozatosan eltűnnek, míg 325 nm-nél egy új abszorpciós maximum jelenik meg és egyre intenzívebbé válik a koncentráció növelésével. Ugyanígy ilyen spektrális viselkedés figyelhető meg a Fungizone spektrumánál is, ami szintén egy kolloid diszperziót alkot. Só hozzáadása az ilyen oldatokhoz csökkenti az oldhatóságot, növeli az aggregáció mértékét, azáltal, hogy csökkenti az elektrosztatikus taszítást a molekulák között.

Az Amphotericin B vizes oldata nem követi a Beer-Lambert törvényt, ami szintén egyik jellemzője az aggregátumok létezésének vizes oldatban. Az alkohol koncentrációja 50% fölött azt eredményezi, hogy a spektrum már jól megközelíti a monomerre jellemző spektrumot, tehát az aggregátumok szétesnek. (Rinnert et al: *Biopolymers*, 616, 2419—2477, 1977).

Az Amphotericin B- γ -CD oldatok ultraibolya spektruma vizes oldatban, illetve pH 7,5-es foszfát pufferben mérve megegyezik a szerves oldószerekben mérttel, adja a monomerre jellemző 408, 385, 366, illetve 347 nm-nél található abszorpciós maximumokat és követi a Beer-Lambert törvényt. A γ -ciklodextrines oldatok ilyen spektrális viselkedése egyik bizonyítéka annak, hogy az Amphotericin B molekulárisan diszpergált valódi oldatot képez a γ -ciklodextrin vizes oldatában, amit ezideig nem sikerült elérni az Amphotericin B egyéb komplexjeivel pl. a borát, illetve dezoikolsavas komplexei vizes közegben micelláris diszperzióknak tekinthetők.

Az Amphotericin B oldhatósága minden esetben erősen csökkent a fiziológiás sóoldatokban, ami infúzióban való alkalmazásának gátat szab. Például: Az Amphotericin B borát komplex vizes oldhatósága 0,54 mg/ml, de ez az érték izotóniás konyhasó oldatban 0,02 mg/ml-re csökken. [Kral et al: *J. of Antibiotics*. 31 (3) 257—259, 1978].

Ezzel szemben az Amphotericin B gamma-ciklodextrinben való oldhatóságát 0,9 tömeg% konyhasó hozzáadása nem változtatta meg, az oldhatóság pontosan ugyanannyi, mint amit a 3. táblázatban feltüntettünk. Ez egy további bizonyítéka annak, hogy az Amphotericin B molekulárisan diszpergált

állapotban található a gamma-CD tartalmú vizes oldatokban.

Az Amphotericin B oldhatóságát is megvizsgáltuk a gamma-ciklodextrin koncentráció függvényében. Különböző koncentrációjú (0; 2; 4; 5; 6; 8; 10 és 12%-os) vizes gamma-ciklodextrin oldatokhoz 5 mg/ml Amphotericin B-t mértünk, majd 37 °C-on termosztálva az oldatokat, intenzíven ráztuk 2 órán keresztül. Az oldatokat tisztára szűrve, spektrofotometriásan határoztuk meg az oldatba ment Amphotericin B mennyiségét. A 3. táblázat mutatja a kapott oldódási értékeket.

3. táblázat

Amphotericin B oldhatósága a gamma-CD koncentráció függvényében

γ -CD koncentráció %	Amphotericin B koncentráció mg/ml
0	0,003
2	0,12
4	0,25
5	0,30
6	0,36
8	0,51
10	0,65
12	0,65

Látható, hogy az Amphotericin B oldhatósága az 5%-os gamma-CD oldatban kb. 100-szorosára, a 10%-os gamma-CD oldatban kb. a 200-szorosára fokozódik, a vízben mutatott oldékonyságához képest.

Az Amphotericin B-gamma-CD komplex cirkulár dikroizmus spektroszkópia vizsgálata

Az amphotericin B vizes oldatban az asszociációs viszonyok tanulmányozására különösen alkalmas a cirkulár dikroizmus spektroszkópia, mivel a monomer, a dimer és a magasabb asszociációfokú polimerek jól megkülönböztethető intenzív cirkulár dikroizmus spektrumot adnak.

Vizsgáltuk az Amphotericin B-gamma-CD komplex (hatóanyag tartalom: 0,6%) vizes és az Amphotericin B 50%-os etilalkoholos oldatának cirkulár dikroizmus spektrumát.

Amint az az irodalomból ismert, 50%-os etilalkoholban az Amphotericin B valódi oldatot alkot, melyben különálló monomer molekulák vannak jelen. [Ernst et al, *Biopolymers*, 20, 1575 (1981)].

Méréseink alapján megállapítottuk, hogy az Amphotericin B-gamma-CD komplex vizes oldatban mért cirkulár dikroizmus spektruma hasonló az 50%-os etilalkoholos oldatban mért Amphotericin B spektrumhoz. A gamma-CD jelenlétében vizes oldatban mért cirkulár dikroizmus spektrumban megjelenik az Amphotericin B monomerre jellemző sávrendszer, mely 420 és 340 nm között jelentkező négy rezgési komponensből összetett pozitív és 290 és 240 nm között található három kompo-

nensből álló negatív sávból áll. 330 és 300 nm között a monomer nem ad spektrumot.

A cirkulár dikroizmus spektrum alapján megállapítottuk, hogy az Amphotericin B-gamma-CD komplex vizes oldatában, kellően nagy gamma-CD koncentráció esetén, az Amphotericin B ugyanolyan monomer alakjában stabilizálódik, mint 50%-os etilalkoholos oldatban. Hígabb oldatban a komplex disszociációja révén felszabaduló Amphotericin B csak dimerizálódik, a jelenlévő gamma-CD megakadályozza a nagy asszociációfokú polimer állapot kialakulását.

A találmányunk tárgya tehát eljárás új, vízoldható és stabilis polién antibiotikum-származékok előállítására, oly módon, hogy vízben korlátozottan oldódó, illetve gyakorlatilag oldhatatlan polién antibiotikumokat gamma-CD-nel reagáltatunk, víz jelenlétében, keverés közben. A polién antibiotikumot 1 mmól antibiotikumra számolva 1—40 mmól gamma-CD-nel reagáltatjuk, 1—500 ml víz jelenlétében. Az eljárás kivitelezésének két módját alkalmazzuk:

a) a polién antibiotikumot 1 mmól antibiotikumra számolva 1—40 mmól gamma-CD-nel reagáltatjuk, 20—500 ml víz jelenlétében, 25—55 °C-on, keverés közben, majd a kapott antibiotikum-gamma-CD-komplexet izoláljuk, vagy

b) a polién antibiotikumot 1 mmól antibiotikumra számolva 1—40 mmól gamma-CD-nel reagáltatjuk, 1—50 ml 20—80 térfogat %-os, vízzel elegyedő szerves oldószer — előnyösen etanol — jelenlétében, keverés illetve gyúrás közben. A kapott antibiotikum-gamma-CD komplexet liofilezéssel, porlasztva szárítással, alacsony hőmérsékleten történő vákuumbepárlással vagy vákuumszárítással izoláljuk.

A találmányunk szerinti eljárással előállított antibiotikum-gamma-CD komplexek felhasználhatók stabilis, injektábilis és lokálisan alkalmazható gyógyászati készítmények, illetve növényvédőszer kombinációk előállítására.

Találmányunk tárgya továbbá eljárás antifungális hatású gyógyászati készítmények — előnyösen hintőpor, szem- és fülcsepp, kenőcs, tableta, hüvelykúp, injekció, szövettenyészetek gombamentésére használható adalékanyag — előállítására, oly módon, hogy az előállított polién-antibiotikum-gamma-CD komplexet a gyógyászati készítményeknél szokásos módon gyógyászati készítménnyé készítjük ki.

Találmányunk tárgya továbbá eljárás antifungális hatású növényvédőszer — előnyösen vetőmagcsávázószer, permetezőszerek — előállítására, oly módon, hogy az előállított polién-antibiotikum-gamma-CD komplexet a növényvédőszer előállításánál szokásos módon növényvédőszerre készítjük ki.

A találmányunk szerinti eljárással előállított polién-antibiotikum-gamma-CD komplexekből homogén oldat készíthető. Pl. az irodalomból ismert 10—30 000 E/ml hatékonyságú szemcsepp, melyben nisztatin vizes szuszpenzió formájában található, előállítható 30—70 mg/ml nisztatin-gamma-CD komplex oldásával, így homogén oldat keletkezik. A megnövekedett vízoldékonyság lokálisan alkalmazott szereknél, nagy valószínűséggel, fokozódó hatékonysággal is együtt jár.

A komplexképzés szempontjából valamennyi polién antibiotikum azonos módon viselkedik, tehát a felsoroltakon kívül például a candidicin, a pimaricin, a candidin, a hamycin, a candihexin, stb. is, ezért találmányunkat nem kívánjuk korlátozni csupán a leírt polién antibiotikumokra.

Találmányunk részleteit az alábbiakban néhány polién antibiotikum gamma-ciklodextrin komplexének előállításán illetve a komplexek alkalmazásán és formulázásán szemléltetjük.

PÉLDÁK

1. példa

A Flavofungin-gamma-ciklodextrin komplex előállítása homogén fázisban.

22 g gamma-ciklodextrint (víztartalma 1,5%) 500 ml desztillált vízben oldottunk 30 °C-on, majd 2,5 g szilárd flavofungint adtunk az oldathoz és három órán át intenzíven kevertettük. Ezután az oldatot leszűrtük és a kapott intenzív sárga szűrletet liofilezéssel vízmentesítettük. A kapott termék 21 g flavofungin tartalma spektrofotometriásan mérve 9,3%, a bevitt flavofunginnak kb. 80%-át kaptuk vissza komplex formájában. A flavofungin-gamma-CD komplex laza, sárga színű por. 100 mg komplex 2,5 ml desztillált vízben 50 °C-on pillanatszerűen tisztán oldódik. Az így készült oldat koncentrációja 3,6 mg/ml flavofunginra nézve, az oldat 6 napon át szobahőmérsékleten szórt fényben tárolva semmiféle fizikai vagy kémiai úton kimutatható változást nem szenved.

Az 1. táblázat oldódási adataiból látható, hogy a 4% körüli gamma-CD oldatnál érjük el az oldódási maximumot, a kb. 4 mg/ml oldott flavofungin koncentrációt, így ez az oldat adja liofilezással való víztelenítés után a legkedvezőbb összetételű 9—10%-os hatóanyagtartalmú komplexet.

A termogravimetriás, a differenciál scanning kalorimetriás (DSC) illetőleg a Thermal Evolution Analysis (TEA) vizsgálatok jellegzetes különbségeket mutattak a flavofungin, a flavofungin-gamma-CD komplex, illetőleg a flavofungin-gamma-CD keverék között. A flavofungin 100 °C-ig 7%-os tömegváltozást mutat, amely a TEA görbe alapján szerves anyag eltávozásából származik. 100 °C fölött bomlani kezd és 300 °C-ig 24% tömegváltozást szenved. A flavofungin-gamma-CD liofilezett minta komplex voltát egyrészt az bizonyítja, hogy a TEA görbén nem jelentkezik 100 °C-ig szervesanyag eltávozás, amely a szabad flavofunginra lenne jellemző, másrészt a DSC görbén sem jelentkezik a flavofungin oxidációjára jellemző, 100—200 °C közötti exoterm változás, ugyanakkor a DSC görbén 263 °C-on jelentkezik egy exoterm folyamatra jellemző csúcs, amely a komplexből felszabaduló flavofungin oxidációjára jellemző.

A flavofungin-gamma-ciklodextrin komplex hőstabilitását vizsgáltuk: az anyagokat 1 mm-es rétegvastagságban oraüvegen kiterítve levegőtől, fénytől nem védetten tároltuk szobahőmérsékleten ill. 60 °C-on szárítószekrényben. A különböző időpontokban vett mintákat spektrofotometriásan analizáltuk.

A kémiai mérések alapján azt találtuk, hogy a

4. táblázat

Flavofungin- és a flavofungin-gamma-CD komplex hőstabilitása szobahőmérsékleten és 60 °C-on, az eredeti hatóanyagtartalom %-ában kifejezve

Idő (nap)	60 °C-on tárolt		Szobahőmérsékleten tárolt	
	flavofungin alapanyag	flavofungin-gamma-CD-komplex	flavofungin + glükóz keverék	flavofungin γ -CD-komplex
0	100%	100%	100%	100%
1	43,8%			
2	23%	100%	90%	100%
5		99,5%	81%	99,5%
7		99%		99%
10		98%	65%	96%
15		94%	49%	94,8%
20		85,4%		95,0%
29		70,5%		95,0%
35		79,2%		94,9%
44		78,7%		94,8%
50		75,0%		94,5%

komplexbe nem zárt flavofungin 60 °C-on már 24 óra után erős bomlást szenved (ezt a teljes UV-spektrum felvétele is igazolja).

Ezzel szemben a flavofungin-gamma-CD komplex eredeti hatóanyagtartalmának közel 75%-a maradt változatlanul 50 nap után is. A szobahőmérsékleten tárolt, 10%-os flavofungin tartalmú, glükózzal alkotott fizikai keverék hatóanyagtartalmának az 50%-a elveszik 14 napi tárolás után; a komplex hatóanyagtartalmának viszont több mint 95%-a 50 nap után is változatlanul megmarad.

A +4 °C-on zárt edényben 7 hónapig tárolt minta nem mutatott hatóanyagcsökkenést. Mérési eredményeinket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

A mikrobiológiai értékmérés is megerősítette, hogy gamma-ciklodextrin komplex formában a flavofungin jóval stabilabb. Flavofungin-gamma-ciklodextrin komplexeket 50 napon át szobahőfokon ill. 60 °C-on tartottunk, ezt követően antifungális hatásuk nem változott. (N₂ atmoszférában mélyhűtőben tárolt flavofungin minta MIC=25 μ g/ml *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. Crusei* és *C. pseudotropicalis* tesztorganizmuson vizsgálva).

2. példa

Flavofungin-gamma-CD komplex előállítása heterogén fázisban

9 g gamma-ciklodextrint (nedvességtartalom 1,5%) dörzsoszárban 1 g flavofunginnal homogenizálunk, majd a keveréket 5 ml 50% etilalkohollal szuszpendáljuk. A szuszpenzió néhány perc keverés után hirtelen megszilárdul, az így kapott kenőcsszerű anyagot vékony rétegben szétterítve vákuumexszikkátorban néhány órán keresztül szárítjuk, majd a szilárd komplexet porítjuk.

A kapott termék tömege: 10 g, hatóanyagtartalma: 10 t%.

Az 1. példában leírt flavofungin-gamma-CD liofilizált komplexnél a 4. táblázatban ismertetett hőstabilitási vizsgálatokat elvégeztük ezzel a termékkel is. Azt találtuk, hogy az így előállított komplex a liofilizált komplexhez hasonlóan megnövekedett hőstabilitást mutatott, és antifungális hatékonysága sem csökkent.

A flavofungin-gamma-ciklodextrin komplex röntgendiffrakciós porfelvételein a jellegzetes reflexziós csúcsok szignifikánsan eltérő 20 ° szögértéknél jelentkeznek, mint a gamma-ciklodextrin és a flavofungin hasonló összetételű fizikai keverékének a pordiagramján. Ez eltérő típusú kristályrácsra utal, ami a komplexképzés tényét támasztja alá. A flavofungin gamma-ciklodextrin liofilizált komplex pordiagramja amorf szerkezetre utal.

3. példa

Nisztatin-gamma-CD komplex előállítása homogén fázisban

10 g gamma-ciklodextrint (víztartalma 1,5%) 90 ml desztillált vízben oldottunk 50 °C-on. Oldódás után 2 g nisztatint (biológiai aktivitása 5033 E/mg) adtunk az oldathoz és 5–15 percen keresztül intenzíven kevertettük. Utána az oldatot leszűrtük, a kapott sárga színű oldatot liofilezéssel víztmentesítettük. A kapott termék 10 g, nisztatin tartalma spektrofotometriásan mérve: 8%, biológiai aktivitása: 399 E/mg. (A nisztatin 2. nemzetközi egysége 4855 IU/mg, ahol IU megfelel 0,0002059 mg aktivitásának. Thomas-Dixon: *J. Biol-Stand.* 10 (4), 369–377, 1982).

A nisztatin-gamma-CD komplex világossárga, laza por. Vízben szobahőmérsékleten gyorsan, tisztán oldódik, a kapott vizes oldatban 8–9 mg/ml nisztatin mérhető (ami megfelel ~100 mg komplex/ml oldott anyagnak). A komplex biológiai értékmérésekor a hatóanyagtartalommal és a

kiindulási nisztatin biológiai aktivitásával arányos aktivitást mutat.

A termogravimetriás, a Differenciál Scanning Calorimetriás (DSC) illetőleg a Thermal Evolution Analysis (TEA) vizsgálatok jellegzetes különbségeket mutattak a nisztatin, a nisztatin-gamma-CD komplex illetőleg a nisztatin-gamma-CD keverék között. A nisztatin 3%-nyi vizet tartalmaz, amelyet 100 °C-ig ad le (TG görbe). Az anyag bomlása 150 °C-on indul meg, egy éles exoterm folyamattal (DSC görbén 165 °C-os csúcs), mely során 8%-os tömegváltozás mérhető (TG-görbe), majd lassú bomlási folyamat következik és 350 °C-ig 54%-os tömegcsökkenés mérhető. Bár a nisztatin bomlása egybeesik a gamma-CD bomlásával, ennek ellenére néhány eltérés tapasztalható a komplex és a fizikai keverék termoanalitikus görbéin, ami a liofilizált minta komplex volta utal. A TEA görbén nem jelentkezik a 160 °C-os szervesanyageltávozásra utaló éles csúcs. A DSC görbén nem látható a komplex mintánál a 165 °C-os nisztatin bomlására jellemző exoterm csúcs, az exoterm folyamat csak 200 °C fölött indul meg. A TG görbén a különbség abban mutatkozik, hogy a liofilizált minta 250 °C fölött gyorsabban bomlik, mint a fizikai keverék.

A nisztatin komplexképzését gamma-ciklodextrinnel ¹³C NMR vizsgálatok is alátámasztják.

Nisztatin-gamma-CD liofilizált mintából készülő oldatok stabilitási vizsgálata:

8%-os hatóanyagtartalmú komplexből 5 mg/ml koncentrációjú vizes oldatot készítettünk, az oldatokat szobahőmérsékleten fénytől nem védve tároltuk, majd különböző időpontokban az oldatok hatóanyagtartalmát spektrofotometriásan ellenőriztük.

5. táblázat

Idő (nap)	Nystatin koncentráció (mg/ml)
0	5,0
1	4,8
2	4,75
5	4,70
6	4,6
7	4,55
8	4,5
10	4,5
12	4,5
21	4,1

Az oldatok másnapra opálosodtak, a mintavétel az oldat összerázása után történt. 400–600-szoros, 50%-os etilalkohollal való hígítás után fotometráltuk, és a $\lambda_{\max} = 304 \pm 1$ -nél jelentkező extinkció értékéből számoltuk a Nystatin koncentrációját.

Az 5. sz. táblázatban látható, hogy 3 heti tárolás után is az eredeti hatóanyagának több mint 80%-a mérhető vissza spektrofotometriásan, vizes oldatban.

Arra vonatkozóan, hogy a biológiai aktivitás milyen összefüggésben van az így mért értékkel, az irodalomban is egymásnak ellentmondó adatok

találhatók. Egyes szerzők szerint a biológiai aktivitás elvesztése 4–8-szor gyorsabban megy végbe, mint az az extinkciócsökkenésből következne, mások szerint parallel csökken az aktivitás az extinkcióval.

(Hamilton-Miller: J. Pharm. Pharmac. 25. 401, 1973). Saját tapasztalatunk, hogy magas extinkció értékhez magas biológiai aktivitás tartozott.

4. példa

Nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex előállítása heterogén fázisban.

9 g gamma-ciklodextrint (nedvességtartalom 1,5%) dörzsmozsárban 1 g nisztatinnal (biológiai aktivitása 5033 E/mg) homogenizáljuk, majd 6 ml 50%-os etilalkoholban a keveréket szuszpendáljuk.

Néhány perc után a szuszpenzió hirtelen beszilárdul, az így kapott anyagot szétterítés és aprítás után exszikkátorban hagyjuk P₂O₅ fölött az oldószer-víz-nyomok eltávolítása végett, majd másnap a szilárd komplexet porítjuk. A termék tömege 10 g, hatóanyagtartalma 10 tömeg%. (Biológiai aktivitása: 450 E/mg).

Az így készült komplex termoanalitikai vizsgálat során ugyanazokat az eltéréseket mutatta a keverékhez képest, mint a 3. példában a liofilizálással előállított komplex. 10 mg/ml hatóanyagának megfelelő mennyiségű nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex és nisztatin alapanyag oldódását vizsgáltuk 15 ml desztillált vízben 37 °C-on. Az oldatokat mágneses keverővel 150 ford/perc sebességgel kevertettük. Az oldatból különböző időközökben mintát vettünk, szűrtük, a szűrlet hatóanyagtartalmát spektrofotometriás mérésel határoztuk meg. A kapott eredményeket a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat

Idő (perc)	nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex (mg/ml)
2	9,0
5	7,2
15	7,8
40	7,4
60	7,2
90	6,0

A nisztatin alapanyag vizes szuszpenzióból vett minták spektruma nem értékelhető, azt kaptuk, hogy az 5 percen belül vett minta spektruma egyezett csak a nisztatinéval, ezután fokozatos bomlás tapasztalható, először a 290 nm körüli maximum torzul, illetve tűnik el, és a kisebb hullámhosszú tartományban új maximumok jelennek meg, ami a kungáit kromofor rendszer károsodására utal.

5. példa

*Nisztatin-gamma-CD komplex előállítás
heterogén fázisban liofilezéssel.*

8 g gamma-CD-t (nedvességtartalom: 1,5%) 80 ml vízben oldunk 40 °C-on, majd 2 g nisztatint (biológiai aktivitás: 5033 E/mg) adunk hozzá. A hőmérsékletet 40 °C-on tartva a szuszpenziót 24 órán át keverjük, majd a kapott elegyet liofilezéssel vízmentesítjük.

A kapott termék 10 g világos sárga színű laza por, hatóanyagtartalom (spektrofotometriásan mérve) 20%. Biológiai aktivitása: 950 E/mg.

A termékben a nisztatin: gamma-CD molarány 1:3. Röntgendiffrakciós vizsgálatok szerint az így nyert komplex amorf szerkezetű. A hasonló módon, de gamma-CD nélkül kezelt alapanyag kristályos volta megmarad, pordiagramja teljesen azonos a kiindulási anyagéval, biológiai aktivitása azonban számottevően leromlik. Amennyiben magasabb hatóanyagtartalmú komplexet készítünk a fenti módszer szerint, akkor a röntgendiffrakciós pordiagramon már megjelennek a kristályos nisztatinra jellemző csúcsok is.

A komplex kioldódási vizsgálata:

500 mg (5. példa szerint előállított) nisztatin-gamma-CD komplexet 10 ml vízben 5 percig keverünk szobahőmérsékleten, a szűrletben spektrofotometriásan 4,5 mg/ml oldott nisztatin koncentráció mérhető.

6. példa

Az Amphotericin B-gamma-ciklodextrin komplex előállítása a következőképpen történt:

10 g gamma-ciklodextrint (víztartalma: 1,5%) 90 ml desztillált vízben oldottunk 37 °C-on, majd 200 mg Amphotericin B-t adunk az oldathoz és 2 órán keresztül intenzíven kevertettük. Ezután leszűrtük, a kapott sárga színű oldatot liofilezéssel vízmentesítettük. A kapott termék 10 g, Amphotericin B tartalma spektrofotometriásan mérve 0,6–0,8 tömeg%.

Az Amphotericin B-gamma-ciklodextrin komplex laza, sárga színű por, vízben gyorsan, tisztán oldódik, a vizes oldat Amphotericin B koncentrációja 0,6–0,8 mg/ml, és az így kapott oldat vízzel, illetve izotóniás oldattal korlátlanul hígítható anélkül, hogy az oldatból szilárd anyag kicsapódna, vagy zavarodás lépne fel. Ez az oldat szobahőmérsékleten 6 napon keresztül tárolva spektrofotometriásan semmiféle mérhető hatóanyagtartalom változást nem mutatott.

7. példa

*A polién antibiotikumok gamma ciklodextrin
komplexeinek hatástani vizsgálata*

Az előzőekben leírtak bizonyítják, hogy a gamma-ciklodextrinnel zárványkomplexet képezve a polién antibiotikumok stabilitása és vízoldékonysága igen jelentősen megnő. A döntő kérdés azonban az, hogy az antifungális hatás is megmarad-e? Ezért vizsgáltuk a különbözőképpen előállított komplexek antifungális hatását azok előállítás

után, amikor is a komplexképzéssel nem védett hatóanyag már jelentős aktivitáscsökkenést mutatott.

a) *A flavofungin gamma-ciklodextrin komplex* vizes oldatának az antifungális hatását 6 sarjadzó és 13 fonalás testgombán vizsgáltuk. Az eredményeket a 7. táblázat szemlélteti. A minimális gátló koncentráció 10–25 µg/ml volt minden esetben a flavofunginra számítva, ami megfelel a nem komplexált hatóanyag hatékonyságának. Különösen figyelemre méltó, hogy a fitopatogen fusáriumok ellen is hat az anyag, ami indokoltá teszi a növényi gombakártevők elleni alkalmazást.

A komplexált anyag flavofunginnal azonos koncentrációban hatékony. A vizsgálatokat agar-diffúziós módszerrel végeztük. A komplex előnye, hogy az oldatkészítéshez szerves oldószer alkalmazása (DMF, illetve DMSO) nem volt szükséges. Ugyanis ilyen oldószerek bizonyos gombákra gátólag hatnak, így alapvetően fontos dolog a mérésnél az oldószer koncentrációt megfelelő vizes hígítással, a már nem gátló érték alá csökkenteni. Gyakorlatban például 1% alatti DMSO koncentráció már megengedett. Bizonyos poliének azonban ilyen hígításban gyakran kicsapódnak, így a vizsgálatokhoz szükséges megfelelő oldat készítése sokszor problematikus. Ajánlott módszerek: az anyagok őrlése, porítása után az oldatkészítést és vizes hígítást mindig közvetlenül a mérés előtt kell elvégezni, (J. Ryley, *Experimental Approaches to Antifungal Chemotherapy*. in: *Advances in Pharm. and Chemotherapy*, No. 18, Academic Press, London, 1981).

7. táblázat

Flavofungin gamma-ciklodextrin komplex minimális gátló koncentrációjának (MIC) vizsgálata in-vitro körülmények között

Teszt organizmus	Flavofungin-gamma-ciklodextrin MIC koncentráció µg/ml-ben
1. Élesztők, illetve élesztőszerű gombák	
Cryptococc. neoform. 78/K-16	5–10
Sacchar. cerevisiae OKI 1282	10
Candida albicans CBS 562	10
Candida tropical CBS 430	25
Candida crusei 79/K 47	10–25
Candida pseud. tr.	5–10
2. Gombák	
Asperg. niger CBS 12648	25
Asperg. fumigatus CBS 11326	25
Penicillin digitatum CBS 31948	25
Penicillin chrysogen. CBS 19646	25–50
3. Patogén gombák	
Sporotr. Schenkii CBS 34035	25
Trichoph. rubrum CBS 30338	25
Trichoph. mentagroph CBS 50148	25
Trichoph. (Keratomyc ajelloi OKI)	25
Epiderm. floccosum OKI, IV.	25
Microsp. gypseum CBS 10064	10–25
Microsp. persic OKI	25
4. Növénypatogén gombák	
Fusarium moniform DSM-IMB 11778	10–25
Fusarium oxysporum DSM-IMB 10975	10–25

A fenti problémák a jól vízoldható és stabilis gamma-ciklodextrin komplex alkalmazásával kiküszöbölhetőek.

b) A nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex biológiai értékmérése agar diffúziós módszerrel *Candida albicans* tesztgomba alkalmazásával történt, a meghatározáskor a komplexek csak vízben lettek oldva, amíg a nisztatin kalciumkloridos metanolban és az így készült oldatok vízzel tovább hígítva. (Ph. Hg. VI. Tomus. II. 827. oldal).

8. táblázat

Néhány komplex hatóanyagtartalma (spektrofotometrián mért) és biológiai aktivitása:

Komplex	Hatóanyagtartalom (UV-spektrofotomet.)	Biológiai aktivitás E/mg
1.	7,5%	351
2.	7,6%	362
3.	8,0%	399
4.	8,4%	450

A komplexképzéshez használt nisztatin alapanyag biológiai aktivitása 5033 E/mg volt.

c) Az *Amphotericin B-gamma-ciklodextrin* komplex antifungális hatékonyságát *Candida albicans* teszt organizmuson ellenőriztük agar-diffúziós módszerrel. A minimálisan gátló koncentráció < 5 µg/ml volt Amphotericin B-re számítva, ami megfelel a nem komplexált anyag hatékonyságának.

8. Polién antibiotikumok gamma-CD komplexeinek felszívódás vizsgálata

a) Nisztatin felszívódása per os adagolt nisztatin-gamma-CD komplexből

5

A felszívódás vizsgálatát egereken végeztük, *Candida albicans* szuszpenzió intravénás adagolásával előidézett sepszis modellen. Az így létrehozott sepszis 2—3 nap alatt 100%-os elhullást okozott.

10

A kísérleti állatoknak per os (p. o.) adagoltunk nisztatin-gamma-CD komplexet, melynek nisztatin tartalma 8% (előállítás a 3. példa szerint történt). Evvel paralell intravénásan (i. v.) adagoltunk nisztatint. A kezeletlen kontrollhoz képest a túlélési idő meghosszabbodott.

15

Ha a nisztatin-gamma-CD komplex formájában per os adagolt és a szabad nisztatin formájában intravénásan adagolt nisztatin azon dózisait összevettük, melyek azonos túlélési idő meghosszabbodást hoznak létre (9. sz. táblázat), azt találtuk, hogy a komplex formából a nisztatin hatóanyagának átlagosan a 6,2%-a került a véráramba.

20

A legmagasabb dózisoknál (i. v. 1,56 és p. o. 25 mg/kg) a túlélési idő visszaesése már a nisztatin enyhe toxikusságának a következménye.

b) Nisztatin felszívódása subcutan adagolt nisztatin-gamma-CD komplexből.

25

Átlagosan 180 g tömegű CFY nőstény patkányokat kezeltünk nisztatinnal, nisztatin-gamma-CD komplexszel (hatóanyagtartalom 8%), illetve gamma-CD-ncl, oly módon, hogy a vizsgálandó anyagok Tween-80-t tartalmazó fiziológiás sóoldattal készült szuszpenzióját subcutan juttattuk az állatokba.

30

A dózisok és az elhullott állatok száma közötti összefüggést a 10. sz. táblázat mutatja.

35

A nisztatin-gamma-CD komplex esetén a 20 mg/kg dózisonál a kezelt állatok 90%-a 48 órán belül elpusztult, míg a szabad nisztatin esetén a 150 mg/kg-os dózisonál sem pusztult el egy állat sem az 1 hetes megfigyelési idő alatt. Kontrollként 10 állatot kezeltünk subcutan annyi gamma-CD-vel, amennyit az állatok a 90%-os elhullást eredménye-

9. táblázat

Nisztatin dózis, i. v. mg/kg	Túlélési idő meghosszabbodás %	Nisztatin dózis, p. o. mg/kg	Túlélési idő meghosszabbodás %	Felszívódott nisztatin i. v./p. o. dózis
0,19	30,2	3,12	33,2	6,09
0,39	43,5	6,25	43,5	6,24
0,78	62,7	12,5	63,0	6,24
1,56	34,6	25,0	38,9	6,24

10. táblázat

Nisztatin					Nisztatin-gamma-CD komplex (hatóanyagtartalom: 8%)				
Dózis mg/kg	Vizsgált állatok száma	Elpusztult állatok száma			Dózis mg/kg	Vizsgált állatok száma	Elpusztult állatok száma		
		24 h	48 h	1 hét			24 h	48 h	1 hét
10	10	0	0	0	10	10	0	0	0
20	10	0	0	0	20	10	8	1	0
100	5	0	0	0					
150	5	0	0	0					

ző nisztatin-gamma-CD komplexszel való kezelés alkalmával kaptak (302 mg/kg). Az 1 hetes megfigyelési idő alatt egy állat sem pusztult el.

A vizsgálatok alapján egyértelmű, hogy a nisztatin-gamma-CD komplexből subcutan toxikus dózis szívódott fel, míg a szabad nisztatin subcutan nem, vagy csak elhanyagolható mértékben szívódik fel.

A felszívódást kvalitatíve vérszintméréssel igazoltuk, felvettük a nisztatin UV-spektrumát, mely alkalmas a szérumban való megjelenésének jelzésére. Vizsgálataink szerint a subcutan adagolt szabad nisztatinból még 200 mg/kg dózis sem adott vérszintet, míg a nisztatin-gamma-CD komplexből már 20 mg/kg dózis jól mérhető vérszintet eredményezett: kezelés után 2—4 órával 6—10 µg/ml értéket mutatott.

9. Polién antibiotikumok gamma-CD komplexeknek hemolízis csökkentő hatásának vizsgálata

a) Nisztatin-gamma-CD komplex

Humán vérből előállított vörösvérsejt-szuszpenzió vizsgáltuk a szabad nisztatin, nisztatin-gamma-CD komplex (hatóanyag tartalom: 8%) és gamma-CD hemolitikus hatását, T. Irie et al. [J. Pharm. Dyn. 6, 408-414 (1983)] módszerével.

Az eredményeket az 50%-os hemolízishez tartozó koncentrációval jellemeztük: EH_{50} .

A szabad nisztatinra kapott érték: $EH_{50} = 57$ µg/ml, mely jól egyezik az irodalomban közöltekkel [J. Antibiotics 22, 1080—81 (1979)], miszerint $EH_{50} = 50$ µg/ml.

Méréseink szerint a nisztatin-gamma-CD komplexnek a nisztatinra vonatkoztatott értéke: $EH_{50} = 115$ µg/ml. Látható, hogy a CD-komplexben a nisztatin hemolizáló hatása a felére csökkent.

A hemolizáló hatás koncentráció függését vizsgálva megállapítottuk, hogy a nisztatin-gamma-CD komplexnek 70 µg/ml nisztatin koncentrációig gyakorlatilag nincsen hemolizáló hatása, ugyanakkor az azonos koncentrációjú szabad nisztatin már 70%-os hemolízist okoz.

A komplexben lévő gamma-CD-vel azonos mennyiségű gamma-CD hemolizáló hatását vizsgálva, azt állapítottuk meg, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően 1600 µg/ml koncentrációig nem okoz hemolízist.

b) Amphotericin B-gamma-CD komplex

Amphotericin B és Amphotericin B-gamma-CD komplex (hatóanyagtartalom: 0,6%, előállítása a 6. példa szerint történt) hemolizáló hatását vizsgáltuk az a) pontban leírt módon.

A szabad Amphotericin B esetében $EH_{50} = 4,8$ µg/ml-nek adódott, mely szintén jól egyezik az irodalomban talált értékkel (5 µg/ml).

Az Amphotericin B-gamma-CD komplex a hatóanyagra számított 25 µg/ml-es koncentráció esetén is csak 2,5%-os hemolízist okozott, míg a szabad Amphotericin B ugyanilyen koncentrációban 92,4%-os hemolízist.

Példák a polién-antibiotikumok-gamma-ciklodextrin komplexekének gyógyszerkészítményekben és növényvédőszerekben történő alkalmazására

10. példa

Nisztatin hintőpor előállítása: 100 000 NE hatás-erősségű nisztatin tartalommal grammonként, 250 mg nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex 1 g-ra kiegészítve talkummal. (A nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex mennyisége 400 E/mg nisztatin biológiai aktivitású anyagra vonatkozik.)

11. példa

Nisztatin szem- illetve fülcsepp: 10 000, illetve 30 000 E nisztatin tartalom milliliterenként, 30, illetve 70 mg nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex, amely 400 NE/mg hatás-erősségű, homogén közegben liofilezéssel sterilén készült, ad 1 ml desztillált víz.

Az oldat célszerűen a felhasználás előtt frissen készítendő, és szobahőmérsékleten tárolva a készítéstől számított 10 napon belül felhasználható. Aktivitásának több mint 70%-át megtartotta ilyen körülmények között is. (A kereskedelmi forgalomban lévő hasonló készítmények a nisztatint mikronizált por alakban tartalmazzák, amiből a felhasználáskor szuszpenziót kell készíteni, amit fénytől védve, hűtőszekrényben kell tárolni, ennek ellenére aktivitásának nagy részét 1 héten belül elveszti).

12. példa

Nisztatin kenőcs: 100 000 NE/g nisztatin tartalom; 1 g 400 NE/mg nisztatin tartalmú gamma-ciklodextrin komplexet keverünk 3 g unguentum-Simplex kenőcshöz.

13. példa

Nisztatin tableta: 200 000 NE nisztatin tartalom tablettánként. 500 mg Nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex (400 NE/mg hatás-erősségű)
145 mg laktóz
30 mg burgonyakeményítő
20 mg talkum
5 mg kalciumsztearát tablettánként.
A tableta összetömege: 700 mg
A tablettákat önmagában ismert módon, közvetlen préseléses technológiával készítjük.

14. példa

Nisztatin hüvelykúp: 100 000 NE nisztatin/kúp 250 mg átlagosan 400 NE/mg nisztatin tartalmú gamma-ciklodextrin komplexet 2 g átlagtömegű Adeps solidus (szilárd-zsír) vagy Massa polyoxyaetheni (polietilén-glikol) alapanyagú kúpba dolgozzuk.

15. példa

Amphotericin B injekció: 5, illetve 10 mg/ml; intravénás infúzióban való alkalmazása.
700, illetve 1400 mg 0,8% hatóanyagtartalmú

steril körülmények között liofilezett Amphotericin-B-gamma-ciklodextrin komplex porampullánként.

A készítmény oldásához szükséges 10, illetve 20 ml steril desztillált víz. A kapott vizes oldat infúzióban való alkalmazáshoz izotóniás sóoldattal, vagy 5%-os Dextrose injekciós oldattal a kicsapódás veszélye nélkül korlátlanul hígítható.

16. példa

Nisztatin oldat szövettenyészetek gombamentesítésére: 10 000 E/ml

25 mg liofilezéssel készített 400 E/mg hatáserős-gű nisztatin gamma-ciklodextrin komplexet oldunk 1 ml desztillált vízben. Az így készített oldat szobahőmérsékleten, fénytől nem védetten való 10 napos tárolás után mérhető biológiai aktivitása 7300 E/ml volt.

A szövettenyészetben célszerűen alkalmazott koncentráció a szövettenyészet milyenségétől függően 10—500 E/ml, ami a fenti oldat megfelelő vizes hígításával állítható elő.

17. példa

Amphotericin B oldat szövettenyészetének gombamentesítésére 250 mg/ml.

630 mg 0,8% hatóanyagtartalmú Amphotericin B-gamma-ciklodextrin komplexet a felhasználáskor 20 ml-re oldunk desztillált vízzel. Az alkalmazott koncentráció a szövettenyészet minőségétől függően 5—50 µg/ml, amit a fenti oldat megfelelő vizes hígításával állítunk elő.

18. példa

Nisztatin tartalmú növényvédőszer illetve csávázószer

A nisztatin mint széles spektrumú gombaölőszer nagyon szerencsésen egészíti ki a Benomyl és a Karbendazim hatásspektrumát. A kedvező összhatást a szabadföldi vizsgálatok eredményei is alátámasztották. Felhasználásra azonban ilyen célra még ezideig nem került sor, a nisztatin vizes-diszperz rendszerekben mutatott instabilitása és nagyfokú oldhatatlansága miatt.

Vetőmagcsávázásra javasolt összetétel:

a 4. példa szerint heterogén fázisban előállított 10 tömeg% hatóanyagtartalmú nisztatin-gamma-ciklodextrin komplex 25% (450 E/mg hatáserős-gű). Benomyl 40%. [1-(butil-karbamoil)-benzimidazol-2-il-metil-karbamát]

Vivőanyag: CaCO₃ 30%

Segédanyag: Na-lignin-szulfonát 5%

A fenti összetételű készítmény önmagában ismert módon készül, és 100 kg vetőmag csávázásához 200 g ilyen készítményt célszerű felhasználni.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás a polién antibiotikumok körébe tartozó tetraén, pentaén, hexaén, heptaén antibiotikumoknak gamma-ciklodextrinnel képezett új, vízoldható és stabilis zárványkomplexének előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, vízben korlátozottan oldódó, ill. gyakorlatilag oldhatatlan, a polién antibiotikumok körébe tartozó tetraén, pentaén, hexaén, heptaén antibiotikumot gamma-ciklodextrinnel reagáltatunk, víz és kívánt esetben vízzel elegyedő szerves oldószer jelenlétében, keverés vagy gyúrás közben, majd a kapott antibiotikum-gamma-ciklodextrin zárványkomplexet izoláljuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy tetraén és hexaén antibiotikumokként nisztatint, pentaén antibiotikumként flavofungint, heptaén antibiotikumként Amphotericin B-t alkalmazunk.
3. Az 1—2. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 1 mmól polién antibiotikumra számolva 1—40 mmól gamma-ciklodextrint alkalmazunk.
4. Az 1—3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polién antibiotikumot a gamma-ciklodextrinnel 25—55 °C-on reagáltatjuk.
5. Az 1—4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vízzel elegyedő szerves oldószerként etanolt alkalmazunk.
6. Az 1—5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapott antibiotikum-gamma-ciklodextrin komplexet liofilezéssel, porlasztva szárítással, alacsony hőmérsékleten történő vákuumbepárlással, vákuumszárítással izoláljuk.
7. Eljárás antifungális hatású gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 1—80 tömeg%-nyi, az 1. igénypont szerint előállított polién-gamma-ciklodextrin zárványkomplex hatóanyagot 99—20 tömeg%-nyi, a gyógyászati készítmények előállításánál szokásosan alkalmazott töltő-, hígító- és segédanyagok segítségével gyógyászati készítménnyé kikészítjük.
8. Antifungális hatású növényvédőszer készítmény, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként 0,25—30 tömeg%-ban polién antibiotikum-gamma-ciklodextrin komplexet, kívánt esetben 10—50 tömeg%-ban egyéb ismert fungicid hatóanyagot, mint 1-(butil-karbamoil)-benzimidazol-2-il-metil-karbamát, és adott esetben a 100 tömeg%-hoz szükséges mennyiségben egyéb, szokásosan alkalmazott segédanyagot, így felületaktív anyago(ka)t, előnyösen etilén-oxid zsíralkoholokkal, alkil-fenolokkal képzett kondenzációs termékeket, kalcium-alkil-aril-szulfonátot, nátrium-lignin-szulfonátot, valamint töltő- és/vagy hígítóanyago(ka)t, így etilén-glikolt, kalcium-karbonátot tartalmaz.

Ábra nélkül

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent a Műszaki Könyvkiadó gondozásában
89-598 — Szegedi Nyomda