

**Parenterálisan alkalmazható, liposzóma alapú diszperziós
eritropoietin készítmények**

KIVONAT KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

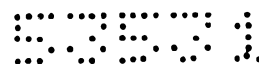
A találmány etanolbefecskendezéses eljárással készült, kiváló stabilitású, parenterális adagolási formájú, liposzóma alapú diszperziós eritropoietin készítményekre vonatkozik.

A találmány szerinti, liposzóma alapú parenterális készítmények magukban foglalnak

- (a) hatásos mennyiségű, eritropoietinből vagy annak farmakológiai szempontból elfogadható származékaiból álló hatóanyagot, amely olyan biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, hogy képes a csontvelő sejtjeit a retikulociták és a vörösvérsejtek termelésének fokozására serkenteni;
- (b) egy olyan lipidfázist, amely
 - (i) lecitinből vagy hidrogénezett lecitinből;
 - (ii) adott esetben alkalmazott, pozitív vagy negatív elektromos töltésű lipidvegyületből;
 - (iii) koleszterinből vagy a koleszterin-észterek és a koleszterin polietilén-glikollal képzett származékai közül kiválasztott vegyületből és
 - (iv) 1-6 szénatomos rövid szénláncú alkoholt tartalmazó alkohol komponensből áll, valamint
- (c) egy foszfátos puffert.

Jellemző aho más

A. Tóth László



**Parenterálisan alkalmazható, liposzóma alapú diszperziós
eritropoietin készítmények**

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány etanolbefecskendezéses eljárással készült, kiváló stabilitású, parenterális adagolási formájú, liposzóma alapú diszperziós eritropoietin készítményekre vonatkozik.

Az eritropoietin (EPO) egy glikoprotein, amely a vörösvérsejt-szintézis szabályozásában a legfontosabb tényező. Az eritropoietin a vesében képződik, és úgy fejt ki a hatását, hogy a csontvelőben levő elősejteket arra serkenti, hogy osztódjanak és érett vörösvérsejteké differenciálódjanak. A rekombinációs módszerrel előállított 165 aminosavat tartalmazó glikoprotein nemrég került forgalomba mint olyan gyógyszer, amellyel hatásosan kezelhetők az anémia különböző formái – beleértve az idült veseelégtelenséggel összefüggő anémiákat –, a zidovidinnel kezelt HIV-fertőzött betegek, valamint a kemoterápiás kezelés alatt álló betegek. A glikoproteint parenterálisan alkalmazzák intravénás (IV) vagy szubkután (SC) injekció formájában.

A napjainkban használatos parenterális kiszerezési formák hordozóanyagként humán szérumalbumint (HSA) tartalmazó, IV- vagy SC-befecskendezésre alkalmas, hagyományosan alkalmazott, steril, pufferolt, vizes oldatok. Ilyen készítményeket az Amerikai Egyesült Államokban EPOGEN® és PROCRT® védjeggyel ellátva hoznak forgalomba. Ezek a termékek az eritropoietint tartósító szertől mentes, 1 ml-es egységdózisok formájában vagy több dózist és tartósítószer is tartalmazó, 2 ml-es ampullákban kiszerezve tartalmazzák.

Aktaszámunk: 92839-3839A/KmO

Ügyintézőnk: dr. Palágyi Tivadar



Bár ezek a készítmények nagyon sikereseknek bizonyultak, a humán szérumalbumin hordozóanyag alkalmazásával összefüggésben bizonyos hátrányok tapasztalhatók. Tekintettel arra, hogy a természetes forrásokból kinyert HSA mint fertőző betegségek – például a HIV vagy a májgyulladás – kórokozójának a hordozója potenciálisan veszélyes lehet, az anyagnak gondos szűrővizsgálaton kell átesnie. Azt is meg kell említeni, hogy a megfelelő minőségű HSA beszerzése gyakran nehézségekkel jár. Igény van tehát olyan befecskendezhető eritropoietinkészítményre, amely nem tartalmaz HSA hordozóanyagot.

Ennek megfelelően, a HSA hordozóanyag kiküszöbölésére megpróbáltunk az eddigieknél jobb eritropoietinkészítményeket előállítani. Célul tűztük ki ugyanakkor azt is, hogy a kifejlesztett készítmények stabilak és az eddig ismert hasonló készítményeknél hosszabb ideig tárolhatók legyenek. Az új készítmények kifejlesztésénél ki akartuk küszöbölni azokat a nehézségeket is, amelyek abból adódnak, hogy a hatóanyag az őt tartalmazó ampulla felületére tapad.

A liposzómák kis vezikulumok, amelyek gömb alakú kettős rétegekben elrendeződve amfipatikus lipideket tartalmaznak. A liposzómák sok koncentrikus, egymástól vízcsatornákkal elválasztott kettős réteget (többrétegű vezikulumok vagy MLV-k) vagy pedig egyetlen membránból álló kettős réteget (egyrétegű vezikulumok) foglalhatnak magukban, amelyek kis egyrétegű vezikulumok (SUV-ok) vagy nagy egyrétegű vezikulumok (LUV-ok) lehetnek. A lipid kettősréteg két olyan monomolekuláris lipidrétégből áll, amely hidrofób "farokrégióval" és hidrofil "fejrégióval" rendelkezik. A membrános kettős rétegben a mono-



molekuláris lipidrétegek hidrofób "farokrészei" a kettős réteg közepétől kifelé, míg a hidrofil "fejrészek" a vizes fázis felé orientálódnak.

A liposzómákkal számos anyagot lehet kapszulázni: hidrofil vegyületeket a vizes belső részben vagy a kettős rétegek között, hidrofób vegyületeket pedig a kettős rétegen belül lehet csapdában tartani. A liposzómák különösen eredményesen alkalmazhatók biológiailag aktív anyagok célbajuttatására, mert kapszulázni lehet velük vízben rosszul oldódó vagy a gyógykezeléshez alkalmazott dózisokban elfogadhatatlanul toxikus vegyületeket.

Különleges, csak egy kettős réteggel rendelkező liposzómák előállítására alkalmas eljárást ismertetnek a 253 619 sz. európai szabadalmi leírásban. Évek óta ismeretesek különféle hatóanyagokat tartalmazó liposzómakészítmények, és ajánlottak már liposzóma alapú eritropoietinkészítményeket is. Így például Maitani és munkatársai olyan, liposzóma alapú eritropoietinkészítményeket javasoltak orális adagolásra [J. Pharm. Sci., **85**, 440-445 (1996)], amelyekhez a liposzómákat a vezikulumok fordított fázisú elgőzölögtetési módszerrel való kialakításával készítik. Tekintettel arra, hogy ebben az esetben a készítményt szájon keresztüli alkalmazásra szánják, a liposzómákba az EPO-t nagy koncentrációban célszerű beépíteni. Ezzel kapcsolatban azonban meg kell jegyezni, hogy ezek a készítmények, amelyek kis vezikulumokban nagy koncentrációban tartalmaznak kapszulázott hatóanyagot, feldúsulhatnak a májban, és mérgezést okozhatnak. Ráadásul, a gyártáshoz ebben az esetben speciális nyersanyagokra (például poliglicerin-fosfolipidre) és szerves oldószerek alkalmazására van szükség. Felhívjuk a figyelmet arra is, hogy a



fordított fázisú eljárás alkalmazása során nagy mennyiségű nem kapszulázott EPO meggy veszendőbe nemkívánatos módon, így ez az eljárás költséges.

A találmány kidolgozásakor tehát olyan parenterális EPO-készítmények kifejlesztését tűztük ki célul, amelyek hordozóanyagként nem tartalmazznak HSA-t, elfogadhatóan hosszú ideig stabilak – így az eddig ismert hasonló készítményeknél hosszabb ideig tárolhatók –, és ipari méretekben alkalmazható eljárással gyárthatók.

A találmány szerinti, liposzóma alapú, parenterális készítmények magukban foglalnak

- (a) hatásos mennyiségű, eritropoietinből vagy annak farmakológiai szempontból elfogadható származékaiból álló hatóanyagot, amely olyan biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, hogy képes a csontvelő sejtjeit a retikulociták és a vörösvérsejtek termelésének fokozására serkenteni;
- (b) egy olyan lipidfázist, amely
 - (i) lecitinből vagy hidrogénezett lecitinből;
 - (ii) adott esetben alkalmazott, pozitív vagy negatív elektromos töltésű lipidvegyületből;
 - (iii) koleszterinből vagy a koleszterin-észterek és a koleszterin polietilénlikollal képzett származékai közül kiválasztott vegyületből és
 - (iv) 1-6 szénatomos rövid szénláncú alkoholt tartalmazó alkohol komponensbőláll, valamint
- (c) egy foszfátos puffert.

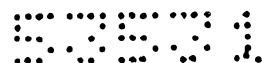


A találmány szerinti készítmények egyetlen kettős réteget tartalmazó liposzómákból állnak, amelyeket úgy állítunk elő, hogy a lipidfázisból alkoholos oldatot készítünk, majd az oldatot nyomás alá helyezve nagy sebességű homogenizálókészülékbe töltött vizes pufferoldatba fecskendezzük. A találmány szerinti liposzómadiszperziót úgy állítjuk elő, hogy az így elkészített liposzómákat eritropoietin hatóanyaggal együtt inkubáljuk.

A hatóanyag előnyös esetben eritropoietinből vagy annak fiziológias szempontból elfogadható származékaiból áll és olyan biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, hogy képes a csontvelő sejtjeit a retikulociták és a vörösvérsejtek termelésének fokozására serkenteni.

AZ EPO-glikoproteint ki lehet nyerni természetes forrásokból vagy elő lehet állítani rekombinációs módszerrel a 4 703 008 sz., az 5 441 868 sz., az 5 547 933 sz., az 5 618 698 sz. és az 5 621 080 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban publikált ismert eljárásokkal. A felsorolt szabadalmi leírások szövegét a találmány ismertetését kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük.

Teljesen váratlan módon azt tapasztaltuk, hogy a találmány szerint, a leírásban ismertetett enyhe körülmények között előállított, liposzóma alapú EPO-készítmények fokozott stabilitást mutatnak, vagyis maguk a liposzómák stabilak, és ugyanakkor a biológiailag hatásos anyag kémiai úton végbemenő bomlása és aggregálódása minimális mértékű. További váratlan előnyként azt tapasztaltuk, hogy az EPO hatóanyag annak ellenére sem tapad rá a tárolóampullára vagy az intravénás fecskendőcső felületére, hogy az EPO főtömegében nem a liposzómákon belül he-



lyezkedik el, hanem gyakorlatilag – liposzóma alapú diszperzió formájában – a közbenső folyadékban található.

A találmány keretében eritropoietinből vagy annak farmakológiai szempontból elfogadható származékaiból álló hatóanyagot alkalmazunk, amely olyan biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, hogy képes a csontvelő sejtjeit a retikulociták és a vörösvérsejtek termelésének fokozására serkenteni. A találmány szerinti liposzómadiszperzió parenterális készítmény formájában felhasználható a kevés vagy csökkentett értékű vörösvérsejt termelésében megnyilvánuló, vérrel kapcsolatos rendellenességek, így például az anémia különböző formái – beleértve az idült veseelégtelenséggel összefüggő anémiákat -, a zidoviddinnel kezelt HIV-fertőzött betegek, valamint a kemoterápiás kezelés alatt álló betegek kezelésére. A találmány szerinti készítmények alkalmazhatók számos kóros állapot és rendellenesség, valamint olyan rendellenes hematológiai állapotok kezelésére is, mint amilyen a sarlósejtes kór, a földközi-tengeri béta-anémia, a cisztás rostos elfajulás, a terhességi és a menstruációs rendellenességek, a koraszüléskor jelentkező korai anémia, a gerincvelősérülések, az ürrepülésnél bekövetkező heveny vérvesztés, az öregedés stb. A találmány szerinti EPO-készítményeket parenterálisan – például intravénásan, intramuszkulárisan, szubkután vagy intraperitoneálisan – előnyös alkalmazni. A hatásos dózisok valószínűleg nagymértékben függenek a kezelt állatoktól, valamint az alkalmazás módjától, de várhatóan a 0,1 (~7 E) μg hatóanyag/kg testtömeg – 100 (~700 E) μg /kg testtömeg tartományban vannak. Az anémiás állapotok kezelésére a hatóanyagot hetenként háromszor, körülbelül 50 – 300 E/kg testtömeg dózisban célszerű alkalmaz-



ni.

A találmány szerinti EPO-liposzómadiszperziók 100 g-onként rendszerint körülbelül 200 000 – 1 000 000 EPO-glikoproteint tartalmaznak. Az EPO hatóanyagot olyan liposzómaszuszpenzióban diszpergáljuk, amelyet a következő komponensekből állítunk elő:

- (a) egy olyan lipid fázis, amely
 - (i) lecitinből vagy hidrogénezett lecitinből;
 - (ii) adott esetben alkalmazott, pozitív vagy negatív elektromos töltésű lipidvegyületből;
 - (iii) koleszterinből vagy a koleszterin-észterek és a koleszterin polietilénlikollal képzett származékai közül kiválasztott vegyületből és
 - (iv) 1-6 szénatomos rövid szénláncú alkoholt tartalmazó alkohol komponensből
- áll, valamint
- (b) egy foszfátos puffer.

Az ilyen készítmények – ezek között is mindenekelőtt a 253 619 sz. európai szabadalmi leírás szerint előállítottak – olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amely lehetővé teszi, hogy megfelelően helyettesítsük velük az eddig ismert hasonló kompozíciókban levő HSL-komponenst. A 253 619 sz. európai szabadalmi leírás szövegét a találmány ismertetését kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük.

A lecitint felhasználhatjuk tisztított természetes lecitin formájában vagy – előnyös esetben – a stabilabb hidrogénezett lecitin formájában. Ha hidrogénezett lecitint alkalmazunk, csökkenteni lehet a stabilizálószer koncentrációját. A lecitinkompo-

nens 100 g kompozícióra vonatkoztatva rendszerint például 0,5-5,0 g mennyiségben van jelen. A hidrogénezett lecitinnek előnyös esetben jó minőségűnek kell lennie, nem szabad észlelhető koncentrációban olyan katalizátorokat tartalmaznia, amelyek negatív módon befolyásolhatják az EPO és a liposzómák stabilitását.

A liposzómastabilizáló szerként alkalmazott koleszterin mennyisége 100 g kompozícióra vonatkoztatva 0,1-1,0 g. A koleszterinen kívül más koleszterinszármazékokat is fel lehet használni, így koleszterin-észtereket, a koleszterin polietilén-glikolszármazékait (PEG-koleszterinek), valamint a koleszterinek szerves savakkal képzett származékait, így például a koleszterin-hemiszukcinátot.

A pozitív vagy negatív elektromos töltésű lipid olyan lipidvegyület, amely pozitívan vagy negatívan töltött komponenssel rendelkezik. Pozitív elektromos töltésű lipidek: oleil-amin és sztearil-amin. Negatív elektromos töltésű lipidek: olajsav és foszfatidinsavak, például a dipalmitoil-foszfatidinsav (DPPA), a dipalmitoil-glicerin (DPPG), a disztearoil-foszfatidinsav (DSPA) és a dimirisztill-foszfatidinsav (DMPA). Ha ilyen töltéssel rendelkező lipideket használunk fel, elektromosan töltött liposzómák keletkeznek, és így – mivel a liposzómák ülepedése gátolt – garantáltan opálos diszperziót kapunk. Amint már említettük, az az eredmény egészen váratlan, hogy az aktív eritropoietin glikoprotein nem tapad a tárolóedény üvegfalához vagy a befecskendezésnél használt szilikoncsőhöz annak ellenére sem, hogy a hatóanyag nem épül be a liposzómákba, hanem csak töltéssel rendelkező liposzómák diszperziójaként van jelen.

Az etanolbefecskendezéses módszer alkalmazásával előállított készítményekben rendszerint jelen van – 100 g készítményre számítva 0,5 g és körülbelül 5,0 g közötti mennyiségben – egy alkohol komponens, amely 1-6 szénatomos rövid szénláncú alkanol, például metanol, etanol, n-propanol, izopropanol vagy n-butanol, előnyös esetben etanol.

A vizes pufferkomponenst a parenterális készítményekben pufferként hagyományosan alkalmazott, tipikusan savas sók közül választhatjuk ki. Ilyen sók például a citrátok, az acetátok és a foszfátok. Foszfátos puffert célszerű alkalmazni. Ilyen puffer például a nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát és a dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, valamint ezeknek a vegyületeknek a keverékei. Előnyös esetben nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát és dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát keverékét alkalmazzuk, 100 g készítményre számítva 0-2,0 g mennyiségben.

A csomóképződés megakadályozása céljából adott esetben stabilizálószerrel, például glicint adhatunk a készítményekhez. Ezzel kapcsolatban azonban megjegyezzük, hogy a legtöbb esetben nincs szükség ilyen stabilizálószerekre, mert a liposzómák a kompozícióban stabilizálószerként, valamint hordozóanyagként működnek.

A találmány szerinti liposzóma alapú kompozíciókat a szakterületen ismert – a 253 619 sz. európai szabadalmi leírásban szereplő liposzómakompozíciók előállításához felhasznált – eljárás alkalmazásával állítjuk elő. A 253 619 sz. európai szabadalmi leírás szövegét a találmány ismertetését kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük. Ezt az eljárást úgy hajtják végre, hogy a foszfolipidből és a hatóanyagból etanolos oldatot készítenek,

majd az oldatot nyomás alá helyezve nagy sebességű homogenizáló készülékbe töltött vizes pufferoldatba fecskendezik. Spontán módon képződnek olyan liposzómák, amelyeknek az átmérője kisebb, mint 1 μm . Részletesebben kifejtve, a találmány szerinti eljárás alkalmazásával úgy állítjuk elő a liposzómákat, hogy tisztított víz felhasználásával vizes pufferoldatot készítünk. A lecitint, a koleszterint és az elektromos töltéssel rendelkező lipid komponenst külön oldjuk fel alkoholban, például etanolban. A vizes oldat és nagy teljesítményű homogenizáló készülék között összeköttetést létesítünk cirkuláció létrehozása céljából, és az alkoholos oldatot közvetlenül a homogenizáló készülékbe fecskendezzük be. Így spontán módon 1 μm -nél kisebb liposzómák keletkeznek. A találmány szerinti liposzómadiszperziót úgy állítjuk elő, hogy az így elkészített liposzómákat eritropoietin hatóanyaggal együtt inkubáljuk.

Ha jól meghatározott átmérőjű liposzómákat tartalmazó, áttetsző liposzómadiszperziót kívánunk előállítani, a liposzómákat célszerű átnyomni olyan szűrőkön, amelyeknek a pórusai körülbelül 0,05-0,08 mm átmérőjűek. Így körülbelül 80-100 nm átmérőjű liposzómákat kapunk. Ezt a nagyság szerinti osztályozást célzó kiegészítő műveletet áttetsző oldat létrehozása céljából alkalmazzuk, hogy bármilyen aggregálódási jelenséget könnyen észleljünk, és a cirkuláltatás idejét meghosszabbítsuk a vérben.

Amint már említettük, a jelenleg kereskedelmi forgalomban levő eritropoietinkészítmények stabilizálószeret – például Tween márkanevű készítményeket vagy aminosavakat – tartalmaznak, korlátozott ideig tárolhatók, és stabilitásuk megőrzése céljából liofilizált állapotban tárolják őket. Tapasztalataink sze-



rint a találmány tárgyát képező, liposzóma alapú készítmények kiváló stabilitást mutatnak, azaz a liposzómák önmagukban stabilak, és ugyanakkor a biológiailag aktív anyag bomlása és aggregálódása minimális mértékű. Akár két évig is tárolhatók, aminek az ipari alkalmazhatóság szempontjából igen nagy jelentősége van. Ez a megnövekedett stabilitás a találmány szerinti kiváló – enyhe körülmények között alkalmazható – gyártástechnológiának, valamint a készítmény komponenseinek és összetételének tulajdonítható, amelyek minőségi és mennyiségi szempontból egyaránt különböznek a szakirodalomban ismertetett hasonló készítmények komponenseitől és összetételétől.

A készítmények stabilitását tovább lehet fokozni oxidációgátló adalékok, például tokoferol, butilezett hidroxitoluol, butilezett hidroxianizol, aszkorbilpalmitát vagy edetátok, például dinátrium-edetát vagy olyan edetátok hozzáadásával, amelyek nemcsak oxidációgátlók, hanem megkötik az esetleg jelenlévő nehézfémeket is. A stabilitást tovább lehet növelni tartósítószerrel, például benzoosav vagy parabének – például metilparaben és/vagy propilparaben – adagolásával.

Előnyösen alkalmazhatók a következő általános recept szerinti készítmények:

	g/100 g
EPO vagy az EPO-nak megfelelő vegyületek	200 000 E – 1 000 000 E
Szójából előállított hidrogénezett lecitin	0,5-5,000
Koleszterin	0,1-1,000



Elektromos töltésű lipid	0,05-0,5
Etanol	0,5-5,000
Glicin	0,0-1,00
Puffer	0-2,0
Adott esetben alkalmazott további adalékok, valamint víz	a 100,00 g eléréséhez szükséges mennyiségben

A találmányra jellemző előnyöket a továbbiakban példákkal szemléltetjük.

1. példa

Liposzóma alapú diszperzió

A 253 619 sz. európai szabadalmi leírásban ismertetett eljárás szerint a következő összetételű, liposzóma alapú diszperziót állítottuk elő:

	g/100 g
Eritropoietin	1 000 000 NE
Szójából előállított hidrogénezett lecitin	0,500
Koleszterin	0,100
Nem denaturált, gyógyszerkészítéshez megfelelő etanol	0,500
Nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát	0,1164
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát	0,2225
Nátrium-klorid	0,584
Tisztított víz	97,9371

Eljárás

A liposzómákat úgy állítjuk elő, hogy vizes elektrolitoldatot (pufferoldatot) készítünk nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrátból,

dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrátból, nátrium-kloridból és injekció elkészítéséhez felhasználható, 80 °C hőmérsékletű vízből. Lecitint és koleszterint külön feloldunk 55-70 °C-os alkoholban, például etanolban. A vizes oldat és a nagy teljesítményű homogenizáló készülék között cirkuláció létrehozása céljából kapcsolatot létesítünk (1. kád), az alkoholos oldatot pedig (2. kád) közvetlenül a homogenizáló készülékbe fecskendezzük be. Az etanolos oldaton az egész eljárás folyamán nitrogént fuvatunk át. Spontán módon 1 mikronnál kisebb liposzómák képződnek. Jól meghatározott méretű liposzómák létrehozása céljából a liposzóma diszperziót definiált – például 0,8 mikronos és 0,5 mikronos – pórusokkal rendelkező "nucleopore" szűrőkön nyomjuk keresztül. Az eritropoietint a liposzóma diszperzióval inkubáljuk, majd steril körülmények között szűrjük. Az ampullákat aszeptikus körülmények között töltjük meg.

Műszaki adatok:

- a homogenizáló készülék fordulatszáma: maximum 13 000 min⁻¹ és
- az etanol oldat térfogatsebessége: 20-100 ml/s.

2. példa

Liposzóma alapú diszperzió

Összetétel:

	g/100 g
Eritropoietin	1 000 000 NE
Szójából előállított hidrogénezett lecitin	0,500
Koleszterin	0,100
DPPA-Na	0,040



Nem denaturált, gyógyszerkészítéshez megfelelő etanol	0,500
Nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát	0,1164
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát	0,2225
Nátrium-klorid	0,584
Tisztított víz	97,9371

Eljárás

A 2. példa szerinti liposzóma diszperziót az 1. példában ismertett módon állítjuk elő azzal az eltéréssel, hogy a lecitint és koleszterint tartalmazó alkoholos oldathoz befecskendezése előtt DPPA-Na-t adunk.

3. példa

Liposzóma alapú diszperzió

Összetétel:

	g/100 g
Eritropoietin	1 000 000 E
Szójából előállított hidrogénezett lecitin	0,500
Koleszterin	0,100
DPPA-Na	0,050
Nem denaturált, gyógyszerkészítéshez megfelelő etanol	0,500
Nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát	0,1164
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát	0,2225
Nátrium-klorid	0,584
Tisztított víz	97,9271

Eljárás

A 3. példa szerinti liposzóma diszperziót a 2. példában ismertetett módon állítjuk elő.

4. példa

Stabilitási teszt

Liposzóma alapú eritropoietin készítményből két gyártási tételt állítunk elő az 1., illetve a 2. példában ismertetett módon. Különböző időközönként vizsgáljuk a gyártási tételek stabilitását. Az *in vitro* és *in vivo* körülmények között végzett biológiai vizsgálatok végrehajtási módszereit az alábbiakban ismertetjük. Az eredményeket az 1. és a 2. táblázatban közöljük.

1. táblázat

Termék: az 1. példa szerinti, liposzóma alapú eritropoietin készítmény

BN: töltéssel nem rendelkező liposzómák

Adagolás: 10000 NE/ml

Tárolási idő [óra]	Tárolási körülmények	Külső megjelenés	pH	EPO-azonosítás	ELISA	Biológiai vizsgálat
0	n.a.	megfelelt	6,86	megfelelt	9695	n.a.
3	2-8 °C	megfelelt	6,97	megfelelt	9194	n.a.
3	25 °C	megfelelt	6,98	megfelelt	8715	n.a.
6	2-8 °C	megfelelt	7,07	megfelelt	9925	n.a.
6	25 °C	megfelelt	7,08	megfelelt	7886	n.a.
9	2-8 °C	megfelelt	7,01	megfelelt	9452	n.a.
12	2-8 °C	n.a.	7,02	megfelelt*	9452	n.a.
18	2-8 °C	n.a.	n.a.	megfelelt	8635	n.a.
24	2-8 °C	megfelelt	7,05	megfelelt	9200	8900**

* = Aggregátumra vonatkozó 2 %-os standardnál kisebb, denzitométerrel meghatározott érték ("2%-AGG-1")

** = Egereken *in vivo* körülmények között végzett biológiai vizsgálat.

2. táblázat

Termék: liposzóma alapú eritropoietin készítmény

BN: negatív elektromos töltésű liposzómák (Na-DPPA)

Adagolás: 10000 IE/ml

Tárolási idő [óra]	Tárolási körülmények	Külső megjelenés	pH	EPO-azo nosítás	ELISA	Biológiai vizsgálat
0	n.a.	megfelelt	6,71	megfelelt	8757	10120
3	2-8 °C	megfelelt	7,03	megfelelt	8776	8020
3	25 °C	megfelelt	7,02	megfelelt	7854	n.a.
6	2-8 °C	megfelelt	7,02	megfelelt	9621	7710
6	25 °C	megfelelt	7,06	megfelelt	8453	n.a.
9	2-8 °C	megfelelt	7,03	megfelelt	9189	8870
12	2-8 °C	megfelelt	n.a.	megfelelt*	9150	n.a.
18	2-8 °C	megfelelt	6,99	megfelelt	9003	9500**
24	2-8 °C					n.a.

* = aggregátumra vonatkozó 2 %-os standardnál kisebb, denzitométerrel meghatározott érték ("2%-AGG-1")

** = egereken *in vivo* körülmények között végzett biológiai vizsgálat; a többi adatot *in vitro* biológiai vizsgálattal állapítottuk meg.

***In vivo* biológiai vizsgálat**

A vizsgálatot exhipoxiás, magas vörösvértestszámú egerek eritropoietines kezelésével végezzük. Egereket 18 órán keresztül csökkentett nyomáson, majd 6 órán át környezeti nyomáson tartunk. A következő 14 napon ezt a műveletet ismételjük. 3 nap elteltével a környezet hőmérsékletén eritropoietint juttatunk az egerek szervezetébe. 1 nap múlva ⁵⁹FeCl₃-tartalmú oldatot fecskendezünk az egerekbe. További 2 nap elteltével vérelemzést

végzünk, és meghatározzuk a vörösvértetekbe beépült $^{59}\text{FeCl}_3$ -at.

***In vitro* biológiai vizsgálat**

Sejtek alkalmazásán alapuló *in vitro* biológiai vizsgálatot végzünk azzal a szándékkal, hogy mennyiségi szempontból pontosan meghatározzuk az alfa-epoetin biológiai aktivitását.

A mintákat először felhígítjuk szövettenyésztéshez használt tápközeggel, majd HEP.G2-sejtkultúrákkal kezeljük őket. Ez a kapcsolódó sejtvonal megőrzi a májszövetnek a szialmentesített fehérjék eltávolítására való képességét. Ismeretes, hogy *in vivo* körülmények között hasonló anyagcsere-folyamat megy végbe, amelynek eredményeként csökken a szialmentesített eritropoietin aktivitása. A HEP.G2-sejtekkel végzett kezeléssel nem távolítjuk el az α -epoetinben levő szialozott eritropoietint a tápközegből. Ezzel az *in vitro* biológiai vizsgálattal tehát utánozzuk az egerek *in vivo* körülmények között végrehajtott vizsgálatát.

A második lépésben a megmaradó eritropoietint elválasztjuk a HEP.G2-sejtektől, és a B6SUtA-sejtvonal felhasználásával sejtburjánzási vizsgálatot végzünk. Ezeket a sejteket eritropoietin jelenlétében tenyésztjük. A tenyészet kiterjedése arányos az eritropoietin mennyiségével. Ezután meghatározzuk a sejtszaporulatot a sejthez hozzáadott MTT hatására keletkező színezőanyag mennyisége alapján. A keletkezett színezőanyag-mennyiség egyenesen arányos a sejtek számával és a B6SUtA-sejtek aktivitásának csökkenésével.

Következtetés

Az adatok szerint a két készítmény akár 24 hónap elteltével is jó stabilitást mutat.

Szabadalmi igénypontok

1. Liposzóma alapú, parenterális készítmények, amelyek magukban foglalnak

- (a) hatásos mennyiségű, eritropoietinből vagy annak farmakológiai szempontból elfogadható származékaiból álló hatóanyagot, amely olyan biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, hogy képes a csontvelő sejtjeit a retikulociták és a vörösvérsejtek termelésének fokozására serkenteni;
- (b) egy olyan lipidfázist, amely
 - (i) lecitinből vagy hidrogénezett lecitinből;
 - (ii) adott esetben alkalmazott, pozitív vagy negatív elektromos töltésű lipidvegyületből;
 - (iii) koleszterinből vagy a koleszterin-észterek és a koleszterin polietilénlikollal képzett származékai közül kiválasztott vegyületből és
 - (iv) 1-6 szénatomos rövid szénláncú alkoholt tartalmazó alkohol komponensbőláll, valamint
- (c) egy foszfátos puffert.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek olyan, egyetlen kettős réteggel rendelkező liposzómákat tartalmaznak, amelyeket úgy állítottunk elő, hogy a lipidfázisból alkohol oldószerrel oldatot készítettünk, majd az oldatot nyomás alkalmazásával nagy sebességű homogenizálókészülékben levő vizes pufferoldatba fecskendeztük.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek további kompo-

nensként stabilizálószer is tartalmaznak.

4. A 3. igénypont szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek stabilizálószerként glicint tartalmaznak.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek hidrogénezett lecitint tartalmaznak.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek alkoholkomponensként etanolt tartalmaznak.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek pozitív vagy negatív elektromos töltésű lipidvegyületként dipalmitoil-foszfátidinsavat – DPPA-t -, dipalmotil-glicerint – DPPG-t -, oleil-amint vagy szteraril-amint tartalmaznak.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek pufferként nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrátot, dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrátot vagy ennek a két vegyületnek a keverékét tartalmazzák.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek további komponensként tartósítószer is tartalmaznak.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek további komponensként oxidációgátló adalékot is tartalmaznak.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek további

komponensként komplexképzőszert is tartalmaznak.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek összetétele a következő:

	g/100 g
EPO vagy az EPO-nak megfelelő vegyületek	200 000 E – 1 000 000 E
Szójából előállított hidrogénezett lecitin	0,5-5,000
Koleszterin	0,1-1,000
Elektromos töltésű lipid	0,05-0,5
Etanol	0,5-5,000
Glicin	0,0-1,00
Puffer	0-2,0
Adott esetben alkalmazott további adalékok, valamint víz	a 100,00 g eléréséhez szükséges mennyiségben

13. Az 1-8., valamint a 12. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek összetétele a következő:

	g/100 g
Eritropoietin	1 000 000 NE
Szójából előállított hidrogénezett lecitin	0,500
Koleszterin	0,100
Nem denaturált, gyógyszerkészítéshez megfelelő etanol	0,500
Nátrium-dihidrogén-foszfát-dihidrát	0,1164
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát	0,2225

Nátrium-klorid	0,584
Tisztított víz	97,9371.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti, liposzóma alapú készítmények közül azok a kompozíciók, amelyek gyógyszerkészítményként anémia kezelésére alkalmazhatók.

*Ábra anémia
1. 1-13. igénypontok szerinti*

A meghatalmazott:



Dr. Palágyi Tivadar
szabadalmi ügyvivő