

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 991 A9

(21) A kérelem ügyszám: P/P 00406
(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 22.
(30) Elsőbbségi adatok:
218 737/901990. 07. 16. JP

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 9/127

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 61943 országkódja: TW
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1991. 07. 15.
Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(72) Feltalálók:

Kikuchi, Hiroshi, Tokió (JP)
Yachi, Kiyoto, Chiba-ken (JP)
Hirota, Sadao, Chigasaki-shi, Kanagawa-ken (JP)

(73) Szabadalmas:

Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd., Tokió (JP)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Liposzóma-készítmények

Az átmeneti oltalom az 1. igénypontra vonatkozik.

A találmány tárgya

A találmány tárgya liposzóma termékek, azzal jellemezve, hogy egy kation egységet tartalmaznak, amelyek vízben oldható hatóanyag tartalmúak, továbbá membrán komponenset tartalmaznak, amely egy anionos foszfolipid és koleszterin. A találmány szerinti liposzóma termékek jobb hatásúak a hatóanyag bevonó képességben, stabilitásban, vér környezetben, ezen túlmenően tárolási stabilitásban.

A találmány előzményei

A liposzómákat igen széles körben alkalmazzák biomembrán formában. Ezen túlmenően kimutatták, hogy energetikusan a liposzómák jellemző példái a hatóanyag kibocsátó rendszereknek (DDS).

Általában azonban amennyiben egy vízdíszható hatóanyagot kapszulázunk liposzómákban szokásos eljárással a kapszulázás hatásossága igen alacsony (legtöbb esetben 0,1–20% közötti). Ennek a jelenségnek két oka van: i) az alacsony molekula tömegű vízdíszható hatóanyag kapszulázása liposzómákban alapvetően úgy történik, hogy a hatóanyagot azonos koncentrációban elosztják a belső vizes fázisban és a külső vizes fázisban a liposzómákban és ii) a liposzómákat, mint különálló részecskéket vizes közegben stabillá alakítják, ehhez az szükséges, hogy a vizes fázis külső állapotban legyen a liposzómák körül, mint diszpergáló közeg.

A fentiek figyelembevételével, amennyiben valamely vízdíszható hatóanyagot kell kapszulázni liposzómákban feltételezik, hogy a hatóanyag kapszulázás hatásosságát igen nehéz megnövelni, különösen 100% körüli értékre.

Az ilyen vízdíszható hatóanyagok vagy membránokhoz kis affinitást mutató hatóanyagok kapszulázásának hatékonyságát ismert eljárásokkal növelhetik és ezek egyebek között az alábbiak: a) reverz fázisú elpárologtatási eljárás (Proceedings of National Academy Sciences of U. S. A., 75, 4194, 1978), b) a hatóanyagok kémiai módosítása (International Journal of Pharmaceutics, 14, 191, 1983; Journal of Pharmacobiodynamics, 7, 120, 1984; Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 36, 3574, 1988), c) egyéb segédanyagok vagy hasonló anyagok alkalmazása (Journal of Pharmaceutical Sciences, 71, 958, 1982; Drug Development and Industrial Pharmacy, 10, 613, 1984), d) a liposzóma membránok jellemzőinek módosítása (Biochimica et Biophysica Acta, 812, 66, 1985; Biochimica et Biophysica Acta, 857, 123, 1986) és e) a hatóanyag töltésével ellentétes töltést hordozó foszfolipid alkalmazása (Biochemical and Biophysical Research Communications, 107, 136, 1982; International Journal of Pharmaceutics, 17, 135, 1983; U. S. Patent No. 4, 769, 250).

A szakirodalomban fent leírt és idézett eljárások azonban nem vezethetnek megfelelő hatásossághoz, amennyiben a vízben oldható hatóanyag kation egységet tartalmaz és ezt kellene liposzómákba kapszulázni. Ezen túlmenően a gyógyászati célra a fenti szakirodalomban leírt eljárásokkal előállított termékek, mint

liposzóma termékek eléggé rossz jellemzőjűek különösen a vérbeni stabilitás szempontjából.

Széles körű vizsgálataink alapján, amelyet abból a célból végeztünk, hogy a fenti problémákat kiküszöböljük kimutattuk, hogy valamely kation egységet tartalmazó vízdíszható hatóanyagot tartalmazó liposzóma termékek, amelyek membrán komponensként anionos foszfolipidet vagy koleszterint tartalmaznak, jobb jellemzőjűek a hatóanyag kapszulázás hatásosságában, valamint tárolás során és a vérben igen stabil terméket szolgáltatnak. A kísérletek eredményeképpen a jelen találmány szerinti készítmény kidolgozása megtörtént.

A találmány tárgya liposzóma termék, amely igen magas hatóanyag kapszulázás hatásosságú és igen nagy stabilitású vérben vagy a tárolás során és amely készítmény igen jól reprodukálhatóan előállítható.

A találmány szerinti készítményt, egy olyan liposzóma termék jelenti, amely az alábbiakkal jellemezhető: liposzóma membrán, amely anionok foszfolipidet és koleszterint tartalmaz alapvető komponensként; és kation egységet tartalmazó vízdíszható hatóanyag, amelynek kapszulázási hatékonysága igen magas.

A találmány szerinti készítményben alkalmazott anionos foszfolipidek olyan anionos foszfolipidek, amelyek 10–30 szénatomot tartalmazó telített vagy telítetlen, egyenes vagy elágazó szénláncú, zsírsav-csoportokat tartalmaznak, előnyösen 14–16 szénatomszámú telített egyenes vagy elágazó szénláncú zsírsav-csoportokat és/vagy telítetlen egyenes vagy elágazó szénláncú kb. 14–20 szénatomot tartalmazó zsírsav-csoportokat tartalmaznak. Ilyen anyagok lehetnek pl. a foszfatidin savak és a foszfatidil-glicerolok, részletebben a dimirisztoil-foszfatidil-glicerol, a dipalmitoil-foszfatidil-glicerol, a foszfatidil-glicerolok, amelyeket természetesen előforduló anyagokból, mint pl. tojásfehérjéből vagy szójababból nyerhetünk, a tökéletesen hidrogénezett foszfatidil-glicerolok, a disztearoil-foszfatidil-glicerol és hasonló anyagok. Előnyösen alkalmazható a dimirisztoil-foszfatidil-glicerol, a dipalmitoil-foszfatidil-glicerol, a tojásfehérjéből származó foszfatidil-glicerol és hasonló anyagok. Az anionos foszfolipid komponens általában a felhasznált hatóanyagra vonatkoztatva nem kisebb, mint 2, előnyösen 3–20 ion ekvivalens mennyiségben alkalmazzuk. Részletebben az ionos foszfolipidet az alkalmazott hatóanyag 1 moljára vonatkoztatva nem kisebb, mint 2 mol, előnyösebben 3–20 mol mennyiségben alkalmazzuk.

A koleszterint, amely a liposzóma membrán egyik komponense a találmány szerint általában a membrán teljes mennyiségére vonatkoztatva kb. 30–60 mol% előnyösebben 40–55 mol% mennyiségben alkalmazzuk.

A találmány szerinti készítményben alkalmazott liposzóma membrán a fent említett két komponensen kívül tartalmazhat semleges foszfolipidet, mint pl. foszfatidil-kolint vagy sphingomyelin-t, valamint a-tokoferolt. A fenti semleges foszfolipideket általában a membrán teljes mennyiségére vonatkoztatva 0–40 mol% mennyiségben alkalmazzuk és a fenti antioxidáns általában ugyanerre a mennyiségre vonatkoztatva kb. 5 mol% mennyiségben használjuk.

A liposzóma termékek vizes közege, amely a liposzómaikon kívül és belül helyezkedik el a találmány szerinti készítményben az alábbi.

Ahhoz, hogy a liposzóma és hatóanyag együttes stabilitását biztosítsuk a vizes fázis pH értéke általában kb. 3–8 közötti legyen. A liposzómák stabilitásához a pH értéke előnyösen 6–8 közötti. Mivel az a pH érték, amely mellett a hatóanyag stabil hatóanyagként változhat a liposzóma termék vizes közegének pH értékét a találmány szerint alkalmasan meg kell határozni olyan határértékek között, amely pH értékek mellett a liposzómák is stabilak és a hatóanyag is stabil állapotú. Ennélfogva pl. a doxorubicin hidroklorid hatóanyag esetében, a kapott liposzóma termékben a vizes fázis pH értéke kb. 4 érték legyen.

A pH érték szabályozásához alkalmazható savak pl. az egy vegyértékű szervetlen savak, mint pl. sósav, salétromsav vagy hidrogén-bromid, vagy egy vegyértékű szerves savak, mint pl. tejsav, glicerinsav vagy ecetsav. Előnyösen alkalmazható savak a sósav és a tejsav. Az ilyen pH érték beállításához alkalmazható bázisok lehetnek egy vegyértékű hidroxidok, mint pl. a kálium-hidroxid, a nátrium-hidroxid és a lítium-hidroxid, valamint az egyvegyértékű aminok, mint pl. trietilamin, a trimetilamin, a diizopropanol-amin, a dietanol-amin, a trietanol-amin, a tetrametil-amin és a trisz(hidroxi-metil)-amino-metán. Előnyösen alkalmazható bázisok a kálium-hidroxid és a nátrium-hidroxid. Ezen túlmenően alkalmazhatók két vegyértékű vagy három vegyértékű iont tartalmazó savak is, mint pl. kálium-elsőrendű-foszfát, nátrium-másodrendű-foszfát és nátrium-karbonát.

A vizes közegben az elektrolit ion koncentráció kívánatosan a lehetséges legalacsonyabb és általában ez a koncentráció a hatóanyag ionjait kivéve nem lehet magasabb, mint kb. 40 mmol.

A vizes közeg ozmotikus nyomása előnyösen a fiziológiai folyadékok nyomásával azonos vagy ehhez közeli értékű. Előnyösen alkalmazható izotóniás hatóanyagok lehetnek a polihidroxi-alkoholok, mint pl. a glicerol vagy propilén-glikol, továbbá a saccharidok, mint pl. a mannitol, a szukróz, a glükóz és a laktóz.

A találmány szerinti készítményben alkalmazható liposzómákat az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A vérben való stabilitás szempontjából a liposzómák általában kb. 50–1,000 nm részecske méretűek, előnyösen 60–300 nm és legelőnyösebben 70–200 nm részecske méretűek legyenek. A liposzómákat ahhoz, hogy ezt a részecske méretet elérjük méretre kell alakítani, amely szokásos eljárásokkal történhet. Például ultrahangos emulzifikálás vagy extrudációs kezelés, amelyet polikarbonát-membránszűrőn nagy nyomással végzünk, alkalmas erre a célra. A vérben való stabilitás szempontjából a találmány szerinti liposzómák kívánatosan számos membránt tartalmaznak. A membránok száma nem limitált értékben vagy értékhatárban. Az ilyen liposzómák úgy állíthatók elő, hogy szokásos méretező technológiát alkalmazunk, amely lehet a fent leírt technológia, különösen előnyösen az extrudálási eljárás.

A „kation egység tartalmú vízzoldható hatóanyag”

elnevezés alatt olyan vízzoldható hatóanyagot érünk, amely vizes oldatban kationt végez (semleges pH területen) és ezek lehetnek pl. az antraciklin daganatellenes hatóanyagok, mint pl. doxorubicin hidroklorid, a daunorubicin hidroklorid, az epirubicin és a pirarubicin, továbbá mikrobaellenes hatóanyagok, mint pl. a gentamicin és a nystatin.

A találmány szerinti liposzóma termékek előállításának eljárását az alábbiakban részletesen ismertetjük.

Különböző ismert eljárásokat alkalmazhatunk erre a célra pl. a *Journal of Molecular Biology*, 13, 238 (1965) közleményben leírt eljárást, amelynek során a fenti liposzóma membrán komponenseket először megfelelő szerves oldószerben, mint pl. kloroformban vagy metanolban oldjuk, majd az oldószert elpárologtatjuk és így lipid-filmképződést idézünk elő. A hatóanyag szempontjából előnyös lehet, hogy a fenti említett hatóanyagot előzetesen a membrán komponensekkel elegyítjük, azonban megtehetjük, hogy a hatóanyagot előzetesen vizes közegben oldjuk és ezt később adagoljuk a keverékhez. A kapott lipid-filmhez ezt követően vizes fázist adagolunk, amelynek teljes elektrolit ion tartalma nagyobb, mint 40 mmol és így hidratálást és duzzadást eredményez. Ezt követően az elegyet diszpergáljuk valamely keverő, mint pl. örvénykeverő alkalmazásával vagy keverési homogenizálás segítségével és így nyers liposzóma diszperziót állítunk elő. Ebben a lépésben amennyiben a vizes fázis hőmérséklete magasabb nagyobb fokú emulzifikálást érhetünk el. Azonban bizonyos esetekben, amennyiben a hőmérséklet túlzottan magas a hatóanyag lebomolhat. Ezt a lépést ebből eredően óvatosan kell végezni. Általában a fenti lépést 50–70 °C közötti hőmérsékleten hajtjuk végre. A fenti lépés során adagolandó vizes közeg puffert, mint pl. foszforsavat vagy tejsavat tartalmazhat. A közeg elektrolit ion koncentrációja ne legyen nagyobb, mint 40 mmol összes koncentráció (leszámítva a hatóanyagot) és a pH érték alkalmasan 3–8 érték közötti. Amennyiben pl. hatóanyagként doxorubicin hidrokloridot alkalmazunk a pH értékét kb. 4 értékre állítjuk be és izotóniás segédanyagként polihidroxi-alkoholt vagy saccharidot adagolunk a fentieknek megfelelően. Ebben az eljárásban nyers liposzóma diszperziót állíthatunk elő bármely más szakirodalomban leírt liposzóma előállítási eljárás szerint is (pl. *Annual Review of Biophysics and Engineering*, 9, 467, 1980 közlemény; JP-A-7932 számú, JP-A-60-7933 számú, JP-A-60-7934 számú, JP-A-60-12 127 számú és JP-A-62-152 531 számú szabadalmi bejelentések, ahol az „JP-A” jelölés a „nem vizsgált közzétett Japán szabadalmi bejelentést jelenti”).

Mivel az így nyert nyers diszperzióban a liposzóma részecskék mérete kb. 1 µm a diszperziót kívánt esetben homogenizált liposzóma diszperzióvá alakíthatjuk át, amely kisebb részecskeméretű egy méret alakító lépés segítségével. A méret alakítást, mint fent leírtuk végezhetjük emulzifikáló kezeléssel, amely ultrahangos keverőt alkalmaz, továbbá Manton-Gaulin homogenizálóval, mikrofluidizáló berendezéssel vagy hasonló homogenizáló keverővel és/vagy végezhetjük

extrudálásos kezeléssel, nagy nyomás alkalmazásával valamely polikarbonát membránszűrőn keresztül, amely adott pórusmérettel rendelkezik.

A találmány szerinti membrán liposzóma készítményben a liposzómák részecskemérete 50–200 nm közötti és ezt a részecskeméretet általában megfelelő kívánt számú membránból nyerhetjük úgy, hogy a nyers liposzóma diszperziót egyszer vagy kétszer polikarbonát membránon bocsátjuk keresztül, amely membrán pórusmérete 0,2 μm . Az átbocsátást magas nyomás alkalmazásával végezzük. Ebben az esetben a szűrőn gyakorlatilag maradék nem található. A nyert liposzómák több membránt tartalmaznak és ezt elektron mikroszkópos vizsgálattal igazolhatjuk, valamint a becsült értékből számíthatjuk, amely a kapszulázott térfogaton alapul, 1 (liter)/m (mol). Ezt a becsülést egy vízdoldható modell hatóanyag és az adott részecskeméret mellett végezzük. Előnyösebben a nyers diszperziót egyszer átbocsátjuk egy nagy pórus méretű szűrőn (pl. 0,6 μm), mielőtt az elegyet átbocsátjuk egy 0,2 μm pórusméretű szűrőn és így a nagyobb részecskeméretű részecskéket előzetesen méretre alakíthatjuk és az idegen anyagokat, valamint az oldhatatlan anyagokat előzetesen eltávolíthatjuk. A fenti méretalakító lépésben nagyobb hatásosságot nyerhetünk, amennyiben a vizes közeg hőmérséklete magasabb. Azonban különösen magas hőmérsékleten a hatóanyag kémiai lebomolhat. Általában a megfelelő hőmérséklet 50 °C–kb. 70 °C közötti érték.

Az így nyert liposzóma diszperziót végső előállítási lépésbe visszük. A pH értékét előzetesen a kívánt értékre állíthatjuk be, alacsony koncentrációjú vizes nátrium-hidroxid vagy kálium-hidroxid vagy hasonló anyag (a fent leírt) alkalmazásával. Természetesen a teljes elektrolit ion koncentráció (a hatóanyagtól eltekintve) kívánatosan 40 mmol vagy ez alatti legyen. A végső előállítási lépést általában egy bakteriális szűréssel kezdjük. Részletesebben a fenti eljárással előállított liposzóma vizes diszperziót egy membránszűrőn bocsátjuk keresztül, amelynek pórusmérete 0,4–0,2 μm közötti. Ezt követően amennyiben a találmány szerinti liposzóma termék valamely vizes diszperzió, a szűrletet úgy osztjuk el ampullákba vagy más tartályokba amilyen mennyiséget kívánunk, amely a tartályokat lezárja. Amennyiben fagyasztott preparátumot kívánunk előállítani a lezárt tartályok tartalmát –5 °C– –80 °C közötti, előnyösen –30 °C– –40 °C közötti hőmérsékletre hűtjük. Ezen túlmenően amennyiben liofilizált készítményt kívánunk előállítani, a szűrletet ampullákba visszük vagy más tartályokba elosztjuk, majd ezt követően szokásos eljárással liofilizáljuk. A kívánatosan alkalmazandó liofilizációs körülményei az alábbiak: gyors fagyasztást hajtunk végre –5 °C– –80 °C közötti, előnyösen –30 °C– –40 °C közötti hőmérsékletre, majd a vizet 0,1 torr vagy alacsonyabb (13,3 Pa) nyomáson szublimáljuk. Végül amennyiben spray-száritott készítményt kívánunk előállítani a fenti vizes liposzóma diszperziót spray-száritásnak vetjük alá és az oldószert eltávolítjuk, majd a kapott porszerű anyag terméket aszeptikus körülmények között ampullákba vagy más alkalmas tartályokba töltjük, amelyeket ezt követően

lezárunk. A spray-száritás körülményei kívánatosan olyanok, amelyek során a bemeneti hőmérsékleten 110–200 °C, előnyösen 120–150 °C közötti érték.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi, hogy olyan liposzóma készítményt állítsunk elő, amely igen magas hatóanyag kapszulázást mutat és amely igen jól reprodukálható. Ezen túlmenően a találmány szerinti liposzóma készítmények a vérben nagymértékben stabilak és ezen túlmenően kiváló liposzóma stabilitásúak, valamint rendkívül hatékony hatóanyag kapszulázási jellemzőkkel rendelkeznek a tárolás során, attól függetlenül, hogy ezek vizes diszperzió készítmények vagy liofilizált készítmény formájúak. Ebből eredően a találmány szerinti eljárással kiváló liposzóma készítményeket állíthatunk elő.

A találmány szerinti készítményt és eljárást a példákban részletesen bemutatjuk. A példák nem jelentik a találmány tárgykörének korlátozását. Az előállítási eljárások, analitikai módszerek és így tovább, azonosak a példák leírásában.

Eljárás nyers liposzóma diszperziók előállítására

1. A Szerves oldószeres eljárás:

A lipid membrán komponenseket és a doxorubicin hidrokloridot üvegtartályba helyezünk, majd tökéletesen feloldjuk kloroform és metanol elegyében. Ezt követően a szerves oldószereket nitrogén gázáramban vagy vákuumban elpárologtatjuk, majd a kapott maradékot exikátorban tovább szárítjuk (vákuumban). Ezt követően a kapott anyaghoz 9 mmol izotóniás laptáppuffert adagolunk, amely megfelel a biológiai ozmotikus nyomás követelményeinek. Ezután az elegyet örvénykeverőben keverjük vagy keverjük, homogenizáljuk megfelelő keverőben enyhe melegítés mellett és így liposzóma nyers diszperziót nyerünk.

2. B Szerves oldószeres eljárás:

A lipid membrán komponenseket, valamint doxorubicin hidrokloridot üvegtartályba helyezünk, majd kloroform és metanol elegyében tökéletesen oldunk. Ezt követően a szerves oldószereket nitrogén gázáramban vagy vákuumban elpárologtatjuk. Ezután a maradékot exikátorban (vákuumban) szárítjuk. Ezt követően a fent leírt puffert készült doxorubicin oldatot, amely biológiai ozmotikus nyomás szempontjából izotóniás vagy 10% szukrózt tartalmazó puffert adagolunk a keverékhez. Ezt követően az elegyet örvénykeverőben keverjük vagy keverő-homogenizáló keverőben elegyítjük enyhe melegítés közben és így nyers liposzóma diszperziót állítunk elő.

3. Polihidroxi-alkohol eljárás:

Szükséges mennyiségű glicerolt helyezünk üvegtartályba, majd ezt melegítjük. Ezt követően a lipid membrán komponenseket duzzasztjuk, majd a glicerolban oldjuk. A kapott oldatot 50–70 °C hőmérsékletre hűtjük, majd koncentrált doxorubicin hidroklorid vizes oldatot adunk hozzá. Az elegyet ezt követően dagasztjuk, majd elkeverjük. Az elegyhez ezt követően a fent említett puffert készült cukor oldatot adagolunk, majd az elegyet 50–70 °C közötti hőmérsékleten ezt követően keverő-homogenizáló be-

rendezésben 50–70 °C hőmérsékleten keverjük. A végső vizes közeg ozmózis nyomását beállítjuk és így ez a biológiai ozmózis nyomással megegyező.

Eljárások liposzóma diszperziók előállítására

1. A Ultrahangos keverési eljárás:

Egy csúcs típusú ultrahangos keverőt merítünk a nyers liposzóma diszperziót tartalmazó tartályba és emulzifikálást végzünk, így vizes liposzóma diszperziót állítunk elő, amelyben a liposzóma részecskemérete 50 nm vagy ennél alacsonyabb.

2. B Ultrahangos keverési eljárás:

Egy csúcs típusú ultrahangos keverőt merítünk egy nyers liposzóma diszperziót tartalmazó tartályba és emulzifikálást végzünk, így olyan vizes liposzóma diszperziót állítunk elő, amelyben a liposzóma részecskemérete 50–200 nm közötti.

3. A Mikro-fluidizáló eljárás

A nyers liposzóma diszperziót mikro-fluidizáló berendezésben emulzifikáljuk és így olyan vizes liposzóma diszperziót állítunk elő, amelyben a liposzóma részecskemérete 50 nm érték vagy ennél alacsonyabb.

4. B Mikro-fluidizáló eljárás

A nyers liposzóma diszperziót mikro-fluidizáló berendezésben emulzifikáljuk és így olyan vizes liposzóma diszperziót állítunk elő, amelyben a liposzóma részecskemérete 50–200 nm közötti.

5. A Extrudálási eljárás

A nyers liposzóma diszperziót nagynyomású szűrésnek vetjük alá polikarbonát-membránszűrőn, amelynek pórusmérete 0,05 µm és így olyan vizes liposzóma diszperziót állítunk elő, amelyben a liposzóma részecskemérete 50 nm vagy ennél kisebb.

6. B Extrudálási eljárás

A nyers liposzóma diszperziót nagynyomású szűrésnek vetjük alá polikarbonát-membránszűrőn, amelynek pórusmérete 0,2 µm és így vizes liposzóma diszperziót állítunk elő, amelynek részecskemérete 50–200 nm közötti.

Analitikai eljárások

Részecskeméret és a membránszám meghatározása

A doxorubicin hidrokloridot tartalmazó liposzómák vizes diszperziója és vizes liposzóma diszperziók, amelyek liofilizált liposzóma készítményből rekonstituáltunk, a liposzóma részecskeméretét kvázi-elasztikus fény szórási eljárással határoztuk meg. Az egyes példákban nyert liposzómák több membránt tartalmaznak és ezeknek a membránoknak a számát elektromikroszkópius méréssel határoztuk meg, valamint azon az alapon becsültük, hogy milyen kapszulázott térfogat (l/mol) mérhető egy vízzeloldható modell hatóanyag esetében az adott részecskeméret mellett.

2. A hatóanyag kapszulázásának hatásossága:

A doxorubicin hidrokloridot tartalmazó liposzó-

mák mindenegyes vizes diszperziója, valamint az egyes liofilizált liposzóma készítményekből rekonstituált vizes liposzóma diszperziók esetében a doxorubicin hidroklorid kapszulázási hatékonyságát határoztuk meg a liposzómákban ultracentrifugálási eljárással.

3. Vérben való stabilitás:

A doxorubicin hidroklorid tartalmú liofilizált liposzómából rekonstituált vizes liposzóma diszperziót (1,5 ml) hozzáadagoltuk 3,5 ml patkány szérumhoz, majd az elegyet 1 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a liposzómákban a doxorubicin hidroklorid kapszulázási hatékonyságot mértük a fenti eljárásnak megfelelően.

Az 1. táblázat adatai szerint bizonyítottuk, hogy a találmány szerinti végső liposzóma termékek 90% vagy ennél nagyobb (közel 100%) doxorubicin hidroklorid kapszulázási képességgel rendelkeznek a liposzómákban, továbbá a végtermékek vérben stabilak.

A 3. példa szerinti liposzómákat tumorelleses aktivitás szempontjából is vizsgáltuk. A készítmények hasonló hatást fejtettek ki, mint a szabad doxorubicin hidroklorid in vitro sejt proliferáció inhibíciósban (tumor sejtek: P388 egér leukémiai sejtek, QG56 humán tüdő pikkelyes karcinoma sejtek, H0C21 humán ovárium rák sejtek és MKN-28 humán gyomor rákos sejtek). Ezen túlmenően meghatároztuk az in vivo tumorelleses hatást (MH-134 ráksejtet hordozó egerekben).

A 3. példa szerinti liposzóma készítményt patkányokban biztonsági tesztvizsgálatnak vetettük alá. Az elektrokardiográfiás, a klinikai szimptóma megfigyelés, a vér kémiai vizsgálat és egyéb tesztvizsgálatok azt mutatták, hogy a liposzómák nyilvánvalóan kisebb kardio-toxicitásúak, kisebb mértékű alopecia okozó hatásúak alacsonyabb mértékű diarrhea előfordulást okoznak, hemotoxicitásuk is alacsonyabb a szabad doxorubicin hidrokloriddal összehasonlítva.

A fentiekből következően nyilvánvaló, hogy a doxorubicin hidroklorid-tartalmú liposzóma találmány szerinti készítmények 90% vagy nagyobb % doxorubicin hidrokloridot foglalnak magukba és ezek igen jól reprodukálható termékek, valamint a vérben nagy stabilitásúak és a doxorubicin hidroklorid által kifejtett toxicitás nagy részét kiküszöbölik.

A 2. táblázatban bemutatott eredményekből kitűnik, hogy más a doxorubicin hidrokloridtól eltérő hatóanyagok, mint pl. amikacin szulfát és streptomycin szulfát is befoglalható a termékbe. A doxorubicin hidrokloridhoz hasonlóan ezek a hatóanyagok is kation-egységeket tartalmaznak és igen nagy hatékonysággal kapszulázhatók a liposzóma találmány szerinti termékekbe. Ezen túlmenően a nyert liposzóma termékek a vérben igen nagy stabilitásúak.

A találmány szerinti termékeket és eljárást a fenti példákban részletesen bemutattuk, azonban természetesen ezek nem limitálják az oltalmi kört és a találmány tárgykörébe beleértjük az összes a találmány lényegét nem befolyásoló terméket és eljárást.

1. táblázat

Példa-szám	Membrán komponensek mennyisége/1,29 mmol doxorubicin hidroklorid mmol (a hatóanyag molaránya) vonatkoztatva			Vizes közeg			Nyers diszperzió előállítás	Méret kialakítás	Részecskeméret (nm)		Kapszulázási hatékonyság az aktív hatóanyag %-ában		
	Alkal-mazott lipid	Kolesz-terin	Egyéb anyag	Oldott anyagok	pH	Meny - nyiség (ml)			Liofilizálás előtt	Liofilizálás után	Liofilizálás előtt	Liofilizálás után	Vérbe-ni stabi-litás (%)
1. példa	DMPG 11,4 (8,8)	14 (10,9)	Tojásfe-hérje PC 4 (3,1)	Szukuróztéj-sav	4,0	10	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	81	103	100,0	99,9	89,1
2. példa	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	2	Poilihid-roxi-al-kohol	B Ext-rudálás	125	130	100,0	100,0	95,2
3. példa	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	20	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	91	90	99,9	99,9	91,4
4. példa	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	20	B Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	85	93	99,8	99,9	88,4
5. példa	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	20	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ult-rahan-gos el-járás	156	178	99,7	100,0	86,5
6. példa	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	20	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Mik-ro flui-dizáló	190	173	100,0	99,8	92,0
7. példa	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	10	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	75	98	99,7	99,8	82,4
8. példa	DMPG 11,4 (8,8)	10 (7,8)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	20	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	95	90	99,9	99,9	86,8
9. példa	DMPG 10 (7,8)	10 (7,8)		Szukuróztéj-sav	4,0	10	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	120	111	100,0	99,7	82,2
10. példa	DMPG 8 (6,2)	10 (7,8)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szukuróztéj-sav	4,0	10	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	132	129	99,8	100,0	88,0
11. példa	DMPG 6 (4,7)	10 (7,8)	Tojásfe-hérje PC 4 (3,1)	Szukuróztéj-sav	4,0	10	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B ext-rudálás	110	107	100,0	99,6	80,2
12. példa	DMPG 6 (4,7)	10 (7,8)	Tojásfe-hérje PC 4 (3,1)	Szukuróztéj-sav	4,0	10	A Szer-ves oldó-szer eljárás	B Ext-rudálás	100	95	99,6	99,5	82,0

Példa-szám	Membrán komponensek mennyisége/1,29 mmol doxorubicin hidroklorid mmol (a hatóanyag moláránya) vonatkoztatva			Vizes közeg			Nyers diszperzió előállítás	Méret kialakítás	Részecskeméret (nm)		Kapszulázási hatékonyság az aktív hatóanyag %-ában		
	Alkal-mazott lipid	Kolesz-terin	Egyéb anyag	Oldott anyagok	pH	Meny - nyiség (ml)			Liofili-zálás előtt	Liofili-zálás után	Liofili-zálás előtt	Liofili-zálás után	Vérbe-ni stabi-litás (%)
13. pél-da	DMPG 4 (3,1)	10 (7,8)	Tojásfe-hérje PC 6 (4,7)	Szuk-róz tej-sav	4,0	10	A Szer-ves ol-dószer eljárás	B Ext-rudálás	98	105	99,9	99,7	84,4
14. pél-da	DMPG 3 (2,3)	10 (7,8)	Tojásfe-hérje PC 7 (5,4)	Szuk-róz tej-sav	4,0	10	A szer-ves ol-dószer eljárás	B ext-rudálás	95	99	99,5	99,6	80,5
15. pél-da	DMPG 11,4 (8,8)	12 (9,3)	Tojásfe-hérje PC 2 (1,6)	Szuk-róz tej-sav	4,0	20	A Szer-ves ol-dószer eljárás	A Ult-rahang-os el-járás	49	223	-	99,9	60,3

1. Megjegyzés DMPG: Dimirisztoil-foszfátidil-glicerol.

DPPG: Dipalmitoil-foszfátidil-glicerol.

Tojásfehérje PC: Tojásfehérje alapú foszfátidil-kloin

2. Megjegyzés: Szukróz-tejsav: 9 mmol laktát puffer, amely 9% szukrózzal kiegészített.

2. táblázat

Példa-szám	Membrán komponensek mennyisége/1,29 mmol doxorubicin hidroklorid mmol (a hatóanyag molaránya) vonatkoztatva			Vizes közeg			Nyers diszperzió előállítás	Méret kialakítás	Részecskeméret (nm)		Kapszulázási hatékonyság az aktív hatóanyag %-ában		
	Alkal-mazott lipid	Kolesz-terin	Egyéb anyag	Oldott anyagok	pH	Meny - nyiség (ml)			Liofili-zálás előtt	Liofili-zálás után	Liofili-zálás előtt	Liofili-zálás után	Vérbe-ni stabi-litás (%)
16. pél-da	DMPG 52 (8,1)	48 (7,5)	AMK 6,40	10% szukróz	-	150	B Szer-ves ol-dószer eljárás	B Ext-rudálás	-	146	-	99,9	91,5
17. pél-da	DMPG 52 (15,2)	48 (14,0)	SM 3,43	10% szukróz	-	150	B Szer-ves ol-dószer eljárás	B Ext-rudálás	-	131	-	98,8	88,7

3. Megjegyzés: AMK: Amikacin-szulfát.

SM: Sztreptomycin-szulfát

SZABADALMI IGÉNYPONT

Gyógyszerkészítmény, amely liposzóma formájú, 50
azzal jellemezve, hogy a készítmény

(1) liposzóma membránt tartalmaz, amely dipalmito-
il-foszfátidil-glicerol vagy dimirisztoil-foszfati-
dil-glicerol és koleszterin, ahol a koleszterin a
teljes membrán komponens mennyiségre vonat-
koztatva 40–55 mol%-ban alkalmazott és

(2) Kation-egységet tartalmazó vízzoldható hatóanya-
got tartalmaz, amely lényegében a fenti liposzó-
ma membránba befoglalt;

és a vizes közegben, amely a liposzómák belsejében
és külső területén található a teljes elektrolit koncent-
ráció nem nagyobb, mint 40 mmol és a liposzómák
részecskemérete 50–1,000 nm, valamint számos
membránt tartalmaznak.