(19) Országkód:
HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:
212 582 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 01166
(22) A bejelentés napja: 1993. 04. 20.
(30) Elsőbbségi adatok:
339 495/921992. 11. 27. JP

(51) Int. Cl.[6]
A 61 K 31/35

(40) A közzététel napja: 1994. 07. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1996. 08. 29.

(72) Feltalálók:
Hamada, Hiroki, Okayama-shi, Okayama-ken (JP)
Kuwahara, Nobuhiro, Yokohama-shi, Kanagawa-ken (JP)
Mikuni, Katsuhiko, Yokohama-shi, Kanagawa-ken (JP)
Saito, Kyoko, Okayama-shi, Okayama-ken (JP)

(73) Szabadalmas:
Ensuiko Sugar Refining Co. Ltd., Yokohama-shi, Kanagawa-ken (JP)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Eljárás taxol ciklodextrin zárványkomplex előállítására

(57) KIVONAT

A találmány taxol ciklodextrinnel vagy elágazó ciklodextrinnel alkotott zárvány-komplexére, valamint a zárvány-komplexek előállítási eljárására vonatkozik. A zárvány-komplexeket úgy állítják elő, hogy 1 mól taxolt 1–20-szoros mólmennyiségű ciklodextrinnel vagy elágazó ciklodextrinnel keverik el.

A találmány szerinti zárvány-komplexek növelik a taxol vízoldhatóságát.

HU 212 582 B

A találmány taxol-ciklodextrin zárvány-komplex előállítási eljárására vonatkozik.

A találmány szerinti megoldás lehetővé teszi a taxol vízben való oldhatóságának növelését oly módon, hogy a taxolt ciklodextrinbe vagy elágazó ciklodextrinbe (a továbbiakban esetenként CD-vel jelöljük) foglaljuk úgy, hogy 1 mól taxolra vonatkoztatva 1–20-szoros mólmennyiségű CD-t alkalmazunk.

A taxol egy az Észak-amerikai tiszafa (Taxus brevifolia) kérgéből extrahált anyag [2aR-[2aα,4β,4aβ,6β,9α(αR*,βS*), 11α-12α, 12aα 12bα]]-β-(benzoil-amino)-α-hidroxi-benzol-propionsav-6,12-b-bis(acetiloxi)-12-(benziloxi)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodekahidro-4,11-dihidroxi-4a,8,13,13-tetrametil-5-oxo-7,11-metano-1H-ciklodeka[3,4]-benz-[1,2-b]oxet-9-il-észter, amely gátolja a rákos sejtek szaporodását. Különösen hatásos a petefészek rákkal szemben és ily mdon egy új, igen jelentős rákellenes szernek tekinthető. A taxol azonban vízben nem oldódik és ily módon a betegnek való adagolás során nem képes felszívódni.

A taxol az utóbbi években vált ismertté és az oldhatóságával kapcsolatban eddig közlemények még nem jelentek meg.

A találmány célja a taxol fentiek szerinti hátrányának kiküszöbölése.

Számos kísérlet alapján a jelen találmány feltalálói felismerték, hogy a taxol oldhatóvá tehető, ha 1 mól taxolra vonatkoztatva 1–20 mól mennyiségű CD-vel keverjük el és ily módon vízben oldhatóvá tesszük. A találmány szerinti megoldást ezen felismerés alapján dolgoztuk ki.

A mellékelt ábrák a következőkre vonatkoznak:

1. ábra: a taxol HPLC kromatogramja.
2. ábra: a taxol abszorpciós spektruma.
3. ábra: taxol-CD HPLC kromatogramja, oldószerként etanol alkalmazása esetén, a 2. példa szerint eljárva.
4. ábra: taxol-CD abszorpciós spektruma, oldószerként etanolt tartalmazva, a 2. példa szerint eljárva.
5. ábra: taxol-maltozil-β-CD háromdimenziós HPLC kromatogramja, oldószerként etanolt alkalmazva és a 2. példa szerint eljárva.
6. ábra: taxol-γ-CD HPLC kromatogramja, oldószerként etil-acetátot és a 2. példa szerinti kézi, fordított rázást alkalmazva.
7. ábra: a taxol-γ-CD komplex abszorpciós spektruma, oldószerként etil-acetátot és a 2. példa szerinti kézi, fordított rázást alkalmazva.
8. ábra: a taxol-γ-CD komplex HPLC kromatogramja, oldószerként etil-acetátot és a 3. példa szerinti 1 órás keverést alkalmazva.
9. ábra: a taxol-γ-CD komplex abszorpciós spektruma oldószerként etil-acetátot és a 3. példa szerinti keverést alkalmazva.

A találmány tehát taxol ciklodextrin vagy elágazó ciklodextrinnel alkotott zárvány-komplexének előállítási eljárására vonatkozik. A találmány szerinti eljárásnál úgy járunk el, hogy taxolt, 1 mól taxolra vonatkoztatott 1–20-szoros mólmennyiségű ciklodextrinnel vagy elágazó ciklodextrinnel elkeverjük. A találmány vonatkozik továbbá a taxol vízben való oldhatóságának növelésére oly módon, hogy a taxolt 1 mól mennyiség taxolra vonatkoztatott 1–20-szoros mól mennyiségű ciklodextrinnel vagy elágazó ciklodextrinnel keverjük el.

A CD/taxol zárványkomplexek előállításához a taxolt először egy szerves oldószerben oldjuk. Erre a célra előnyösen például etil-acetátot, metanolt, etanolt, acetont, különösen előnyösen etanolt alkalmazunk. A felhasznált szerves oldószer mennyisége különösebben nem korlátozott, amennyiben a felhasznált mennyiségben a taxol oldódik.

Ezután 1 mól taxolra vonatkoztatott 1–20-szoros mólmennyiségű CD-ből vizes oldatot készítünk és a fentiek szerinti taxololdathoz adagoljuk. Az előállítási eljárásnál általában előnyös, ha az oldatokat keverjük és még előnyösebb, ha azokat erőteljesen keverjük. A találmány szerinti eljárásnál a reakcióhőmérséklet értéke nem kritikus, a reakciót megfelelően szobahőmérsékleten is véghez vihetjük. A reakcióidő értéke néhány perctől néhány óráig terjed, előnyösen 2 perc és 1 óra közötti időt alkalmazunk.

Ezen reakció során a taxolt a CD molekulák magukban foglalják. A találmány szerinti megoldásnál például a következő CD-ket alkalmazhatjuk: α-CD, β-CD, γ-CD, glükozil-α-CD, glükozil-β-CD, glükozil-γ-CD, maltozil-α-CD, maltozil-β-CD, maltozil-γ-CD, maltotrizil-α-CD, maltotziozil-α-CD, maltotriozol-β-CD, maltotriozil-γ-CD, valamint ezek megfelelő keveréke.

Amennyiben a Cd-t a γ taxolhoz viszonyított ≤ 1:1 mólarányban alkalmazzuk a taxol oldhatósága megfelelő mértékben nem növekszik, ha a mólmennyiség 1:20 értéknél nagyobb, a feleslegben alkalmazott CD már nem vesz részt a zárvány-komplex kialakításában.

A reakcióoldat megszárításával stabil CD/taxol zárvány-komplexet nyerünk, amely vízben igen jól oldódik.

Amennyiben a fentiek szerint CD/taxol zárvány-komplexet állítunk elő és azt a betegeknek intravénásan, orálisan vagy más ismert módon adagoljuk, a betegnek a taxol igen hatásos mennyiségét tudjuk beadagolni. Ily módon a taxol fiziológiai aktivitását igen hatásosan biztosítjuk.

A találmány szerinti CD/taxol zárvány-komplexeket a legkülönbözőbb formában alkalmazhatjuk. Így például előállíthatunk belőlük injekciókészítményeket vagy porformában is alkalmazhatjuk további feldolgozás nélkül, vagy a porokat granulálhatjuk, tablettázhatjuk vagy kapszulákba is tölthetjük, általában a betegnek legmegfelelőbb formát választjuk. Természetesen a zárvány-komplexek felhasználhatók az eredeti oldat formájában is. Továbbá, hasonló hatást várhatunk akkor is, ha a taxolt kémiailag módosított CD-vel, így például hidroxi-propil-CD-vel visszük zárvány-komplexbe.

A következő példákban a találmány szerinti megoldást illusztráljuk közelebbről a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

A példákban a különböző típusú CD-k hatását mutatjuk be a taxol oldhatóságára.

1 mg taxolt feloldunk 2 ml etil-acetátban. Közben mindegyik vizsgált CD-t 2 ml vízben oldjuk olyan mennyiségben, hogy a taxol:CD mólaránya 1:1, 1:5, 1:10 és 1:20 legyen. CD-ként a következőket alkalmazzuk: α-, γ-, maltozil-α-, maltozil-β- és maltozil-γ-CD.

A taxol oldatot, valamint a CD oldatokat vizsgálócsőbe helyezzük, amely dugóval van ellátva és a csöveket 30-szor ismételt kézi rázással felfordítva keverjük. Ezután az etil-acetátos réteget elválasztjuk és mérjük az abszorpció értékét 255 nm-en a vizes rétegben átkerült taxol mennyiségének meghatározására. A taxol oldhatóságát úgy számoljuk, hogy levonjuk azt az oldhatósági értéket, amelyet akkor határoztunk meg, amikor a vizes fázis CD-t nem tartalmazott (vakpróba), ezeket az értékeket tartalmazza az 1. táblázat. Azaz, mivel az etil-acetát vizes fázisba vándorol, és így kis mennyiségű taxol oldódik benne, még a vakpróba esetén is, amikor CD nincs jelen, a kapott 0,589 mg/2 ml víz oldhatósági értékeket levonjuk az egyes oldhatósági értékekből, ezeket tartalmazza az 1. táblázat, amely értékek így a taxol megnövekedett oldhatóságát jelzik vízben a CD adagolás hatására.

1. táblázat

Taxol megnövekedett oldhatósága vízben különböző CD-k alkalmazásával

Mólarány (taxol:CD)	1:1	1:5	1:10	1:20
α-CD	0,067	0,036	0,213	0,186
γ-CD	0,045	0,050	0,315	0,319
Maltozil-α-CD	0,048	0,102	0,106	0,208
Maltozil-β-CD	0,036	0,017	0,120	0,132
Maltozil-γ-CD	0,055	0,044	0,183	0,118 (mg/2 ml víz)

A fenti adatokból látható, hogy a taxol oldhatósága megnövekszik, ha az alkalmazott CD és a taxol közötti mólarány 1:1 vagy ennél nagyobb. Látható – a maltozil-α-CD kivételével – hogy megfelelő eredményt nyerünk a CD adagolással, ha a mólarány 1:10 vagy annál nagyobb.

Látható továbbá az is, hogy a különböző típusú CD-k közül a -γ-CD mutatja a legjellemzőbb hatást, ily módon ez tekinthető a legelőnyösebb anyagnak a taxol oldhatóságának fokozásához.

2. példa

Ebben a példában a CD/taxol zárvány-komplexek oldhatóságát sokkal pontosabb módon határoztuk meg, mint az 1. példában, valamint vizsgáltuk a taxol oldásához alkalmazott szerves oldószerek hatását is.

1 mg taxolt feloldunk 2 ml etanolban és mindegyik típusú CD-ből oldatot készítünk 2 ml vízben úgy, hogy a mólarány (taxol:CD) 1:1, 1:5, 1:10 és 1:20 legyen. CD-ként α, γ, maltozil-α- és maltozil-γ-CD-t alkalmaztunk.

A taxololdatokat, valamint a CD oldatokat beépített dugóval ellátott vizsgálócsövekbe helyezzük és az 1. példában leírt módon kézi rázással felfordítva elkeverjük. Az oldatokat ezután rögtön megfagyasztjuk, majd liofilizáljuk, amely során a vizet és a szerves oldószert teljesen eltávolítjuk.

Ezután 2 ml vizet adunk mindegyik liofilizált termékhez, a kapott keveréket keverjük és centrifugáljuk, majd a felülúszóban meghatározzuk a taxol oldhatóságát nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (HPLC). A kapott eredményeket a következő 2. táblázatban foglaljuk össze. Hasonlóan azokkal a vizsgálati eredményekkel, amelyeknél ugyanígy jártunk el, de a 2 ml etanol helyett 2 ml etil-acetátot alkalmaztunk oldószer helyett.

A HPCL vizsgálati körülmények a következők:
Oszlop: Crestpack (Jasco)
Oldószer: metanol:víz = 60:40
Áramlási sebesség: 1 ml/perc
Oszlop hőmérséklet: 40 °C
Detektor: ultraibolya detektor

2. táblázat

Az oldószer befolyása a taxol oldhatóságára vízben

	Etil-acetát	Etanol
α-CD	0,4	14,5
γ-CD	10,8	117,9
Maltozil-α-CD	3,1	11,1
Maltozil-β-CD	4,4	42,8
Maltozil-γ-CD	8,1	38,0 (μg/mg víz)

A taxol vizsgálatához a CD-vel nem kelezt taxolt etil-acetátban feloldjuk, különböző koncentrációjú oldatokat készítünk, és meghatározzuk ezek HPLC kromatogramjait. Egy ilyen kromatogramot mutatunk be az 1. ábrán, az abszorpció spektrumot a 2. ábrán. A 3. ábrán látható azon HPLC kromatogram, amikor etanolt és γ-CD-t alkalmaztunk, és az egyidejűleg mért abszorpciós spektrumokat a 4. ábrán mutatjuk be. Az 1–3-as ábrából a csúcsok alapján nyert információkat a következő táblázatban foglaljuk össze.

	Idő (perc)	AUFS	Csúcs hullámhossz
1. ábra (1)	17,27	0,078	230
3. ábra (1)	28,95	0,038	218
3. ábra (2)	17,27	0,015	230
3. ábra (3)	11,26	0,005	284
3. ábra (4)	3,86	0,036	214

Az 5. ábrán bemutatjuk a háromdimenziós HPLC kromatogramját azon terméknek, amikor etanolt és maltozil-β-CD-t alkalmaztunk, valamint a 6. ábrán HPLC

kromatogramját azon terméknek, amikori etil-acetátot és γ-CD-t alkalmaztunk. Egyidejűleg a csúcsoknál meghatározott abszorpció spektrumot a 6. és 7. ábrán mutatjuk be. A 6. ábrán bemutatott csúcsokból nyert információkat a következő táblázatban mutatjuk be.

	Idő (perc)	AUFS	Csúcs hullámhossz
6. ábra (1)	3,86	0,008	214, 238
6. ábra (2)	17,02	0,004	228
6. ábra (3)	28,78	0,006	218

Az ábrákból látható, hogy azon taxol minták, esetében, amelyekhez CD-t adagoltunk, a retenciós idők, valamint a HPLC-nél mutatkozó abszorpciós spektrumok eltérőek azon értékekhez képest, amelyeket a taxolon önmagában határoztunk meg. Ez a tény jelzi, hogy a taxol funkcionális csoportjait a CD magába zárta. Úgy gondoljuk, hogy a CD a taxol hidrofób csoportjaival képez zárvány-komplexet és így növeli annak oldhatóságát. Az oldhatóság növekedés nagyobb volt azon esetben, amikor a taxol oldására etanolt alkalmaztunk, mint amikor etil-acetátot. Ez, úgy gondoljuk, annak tudható be, hogy a taxol konfigurációját az oldószer megváltoztatja. Ha oldószerként etil-acetát helyett etanolt alkalmazunk, a γ-CD különösen megnöveli a taxol oldhatóságát és ily módon ez tekinthető a legkiválóbb szolubilizáló anyagnak.

3. példa

20 mg taxolt feloldunk 40 ml etil-acetátban, 200 mg γ-CD-t feloldunk 40 ml vízben és a két oldatot elkeverjük és 1 órán át keverjük. Ezután a kapott keveréket hagyjuk állni, a vizes fázist kinyerjük és liofilizáljuk. A kapott szárított termékhez 40 ml vizet adunk, a keveréket oldódásig keverjük, majd centrifugáljuk, ezután eltávolítjuk a taxolt tartalmazó felülúszót és HPLC-vel vizsgáljuk. A HPLC vizsgálati körülmények azonosak a 2. példánál ismertetett körülményekkel. A kapott eredményeket a 8. ábrán mutatjuk be, a 9. ábrán a 8. ábra szerint csúcsok abszorpciós spektrumát ábrázoljuk. A csúcsokból nyert információkat a következő táblázatban foglaljuk össze.

	Idő (perc)	AUFS
8. ábra (1)	16,45	0,041
8. ábra (2)	17,19	0,046

A kapott eredmények azt mutatják, hogy 81,5 μg taxol van oldva 1 mg vízben. Ha ezt az értéket a 2. példában megadott 10,8 μg-os értékhez hasonlítjuk, amely értékek a minta 30-szor ismételt kézi rázása esetén nyertünk, világosan látható, hogy az oldhatóságban igen jelentős növekedés állt be. Ennek oka feltehetően a hosszabb keverési idő (reakcióidő), amely 1 óra vagy még hosszabb, mindenképpen több mint a 2. példában.

Ha a HPLC kromatogramokat hasonlítjuk össze, a retenciós idők 3,86, 17,02 és 28,78 (6. ábra) a kézi felfordítaó rázás esetén, míg a kevertetés esetén a retenciós idők értéke 16,45 és 17,19 (8. ábra). Továbbá, az abszorpciós spektrumok 230 nm körüli értékek (9. ábra). Ez feltehetően annak tudható be, hogy bizonyos CD arányok esetén a zárvány-komplexek kialakulásánál egyensúly áll be.

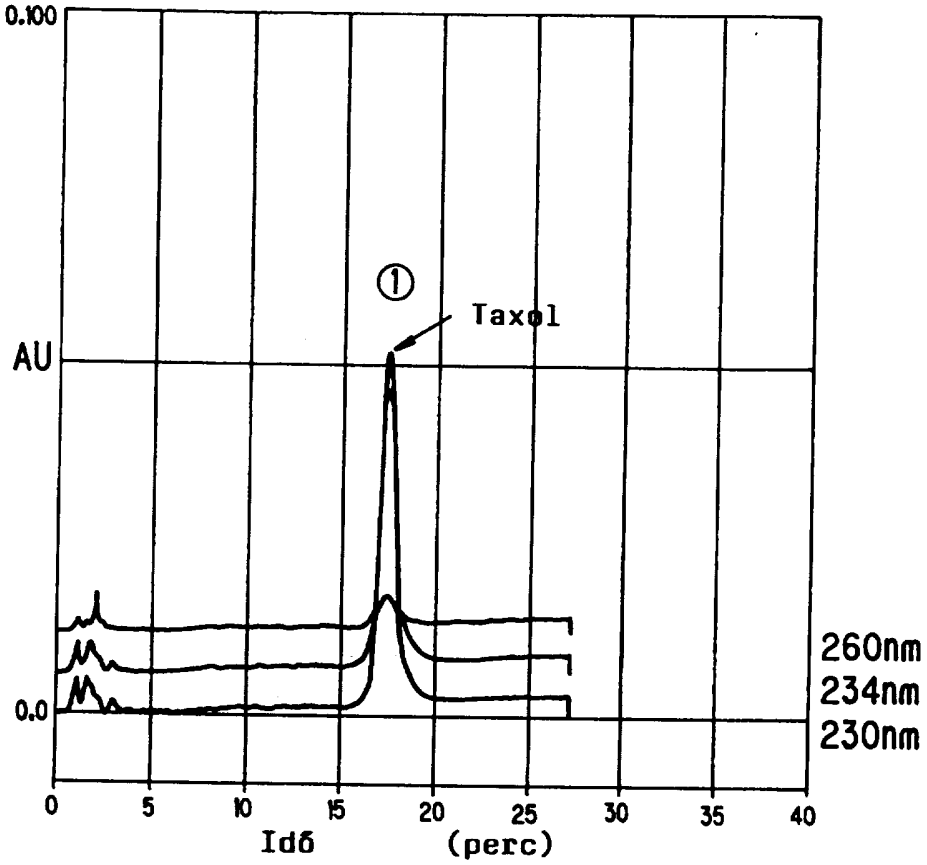
Így 1 órás reakcióidőnél egy egyensúlyi érték alakulhat ki, a taxol oldhatósága és oldatba vihetősége általában növekszik. A fentieknek megfelelően a találmány szerinti megoldással a taxol oldhatósága vízben növelhető és a taxol oldhatóvá tehető, ha CD-t adagolunk hozzá 1–20-szoros mólmennyiségben. Ily módon ha a találmány szerinti CD/taxol zárvány-komplexek formájában taxolt adagolunk rákos betegeknek, az könnyen felszívódik és ily módon a taxol fiziológiai hatását sokkal nagyobb mértékben hasznosítja.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

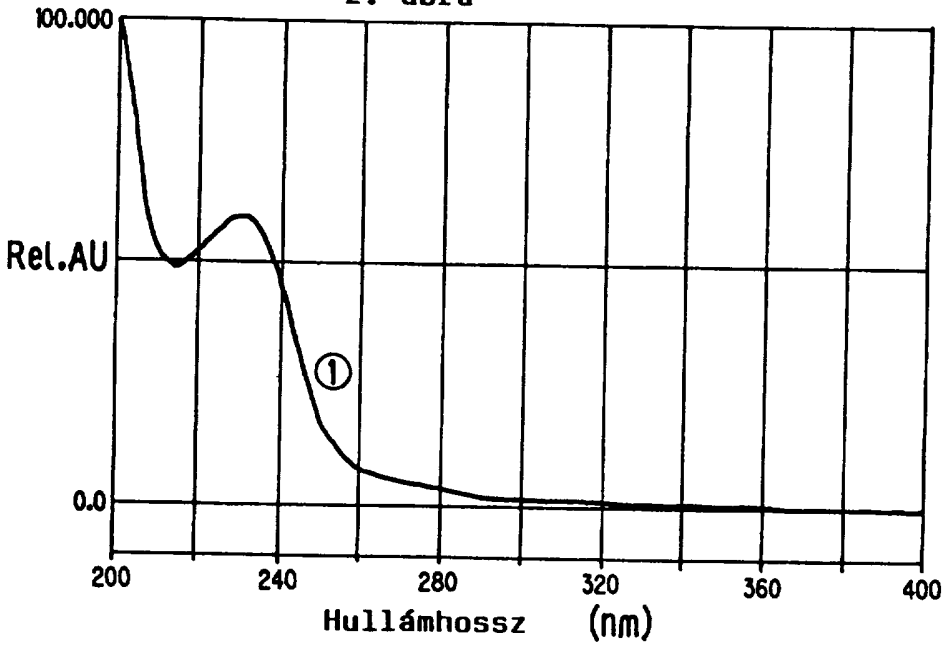
1. Eljárás taxol, [2aR-[2aα,4β,4aβ,6β,9α(αR*,βS*), 11α-12α, 12aα 12bα]]-β-(benzoil-amino)-α-hidroxi-benzol-propionsav-6,12-b-bis(acetiloxi)-12-(benziloxi)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodekahidro-4,11-dihidroxi-4a,8,13,13-tetrametil-5-oxo-7,11-metano-1H-ciklodeka[3,4]-benz-[1,2-b]oxet-9-il-észter és ciklodextrin vagy elágazó ciklodextrin zárvány-komplexének előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 1 mól taxolt 1–20-szoros mólmennyiségű ciklodextrinnel vagy elágazó ciklodextrinnel keverünk fel.

2. Eljárás a taxol vízben való oldhatóságának növelésére, *azzal jellemezve*, hogy 1 mól taxolt 1–20-szoros mólmennyiségű ciklodextrinnel vagy elágazó ciklodextrinnel keverünk el.

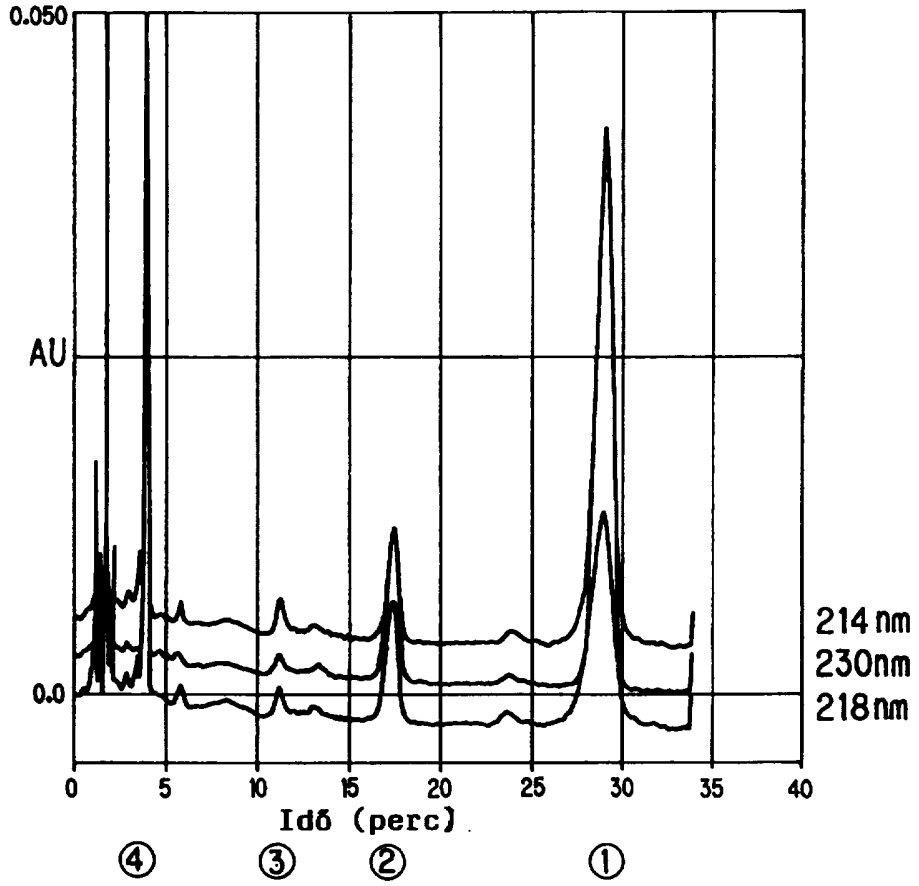
1. ábra


0.100
AU
0.0
①
Taxol
260nm
234nm
230nm
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Idő (perc)

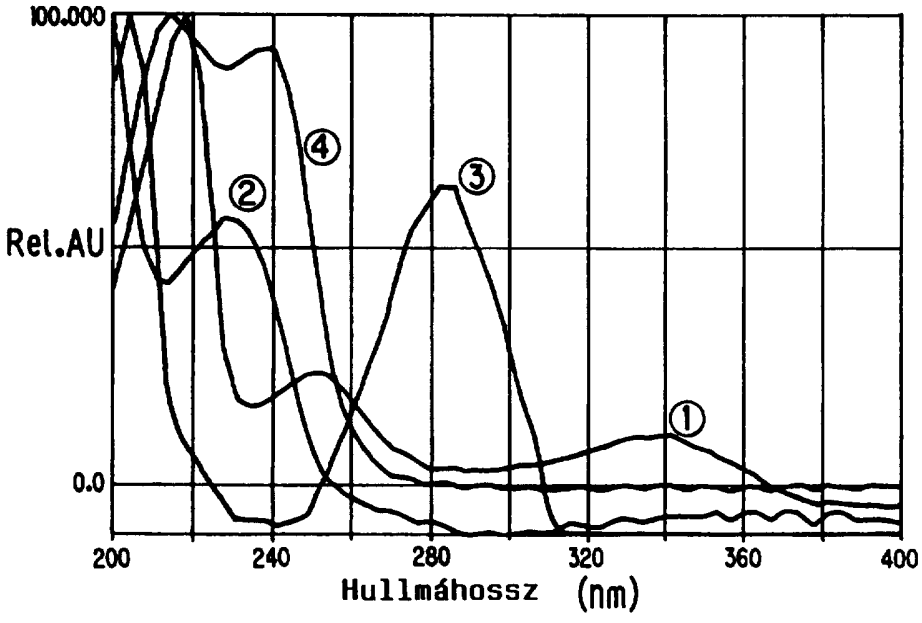
2. ábra


100.000
Rel.AU
0.0
①
200
240
280
320
360
400
Hullámhossz (nm)

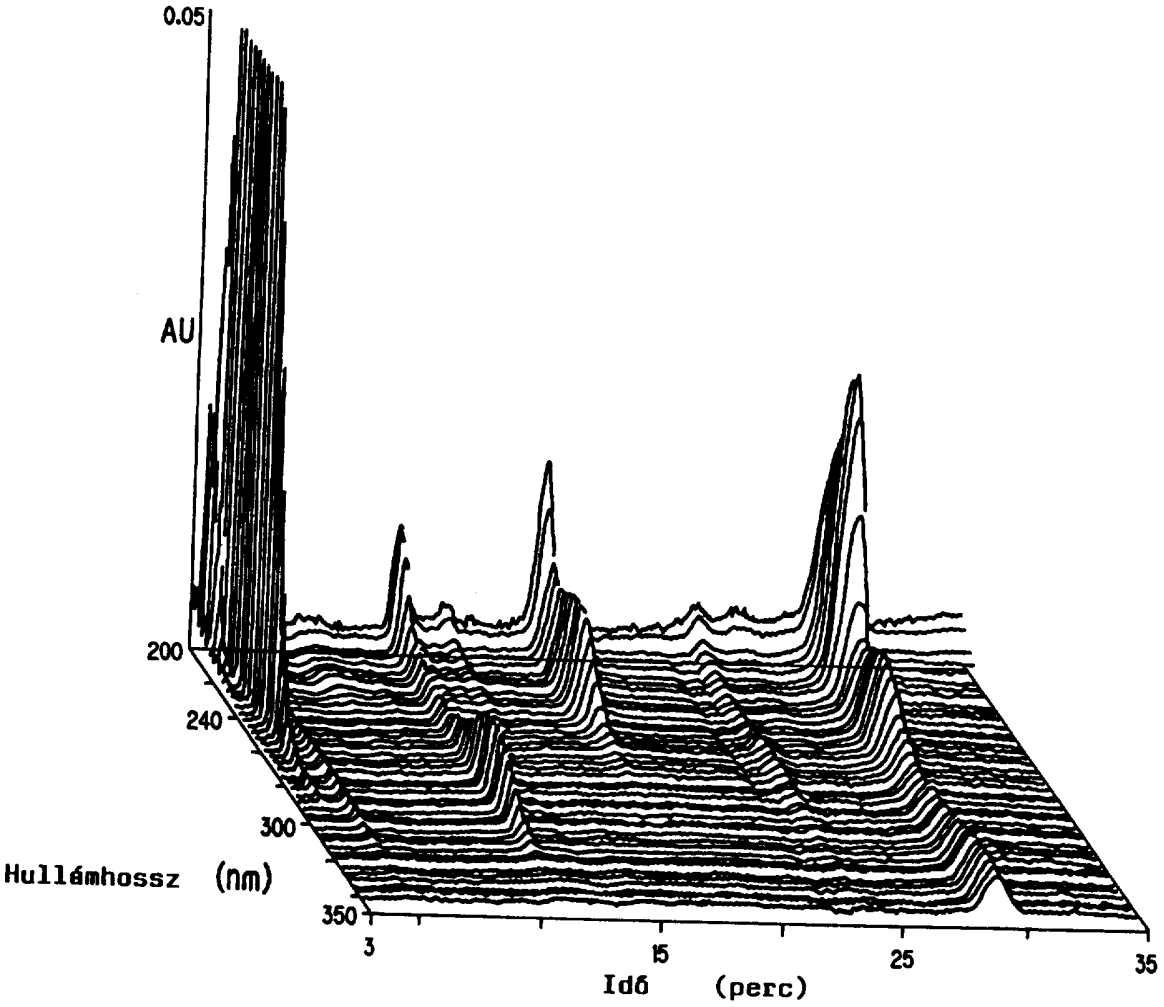
3. ábra


0.050
AU
0.0
214 nm
230nm
218nm
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Idő (perc)
④
③
②
①

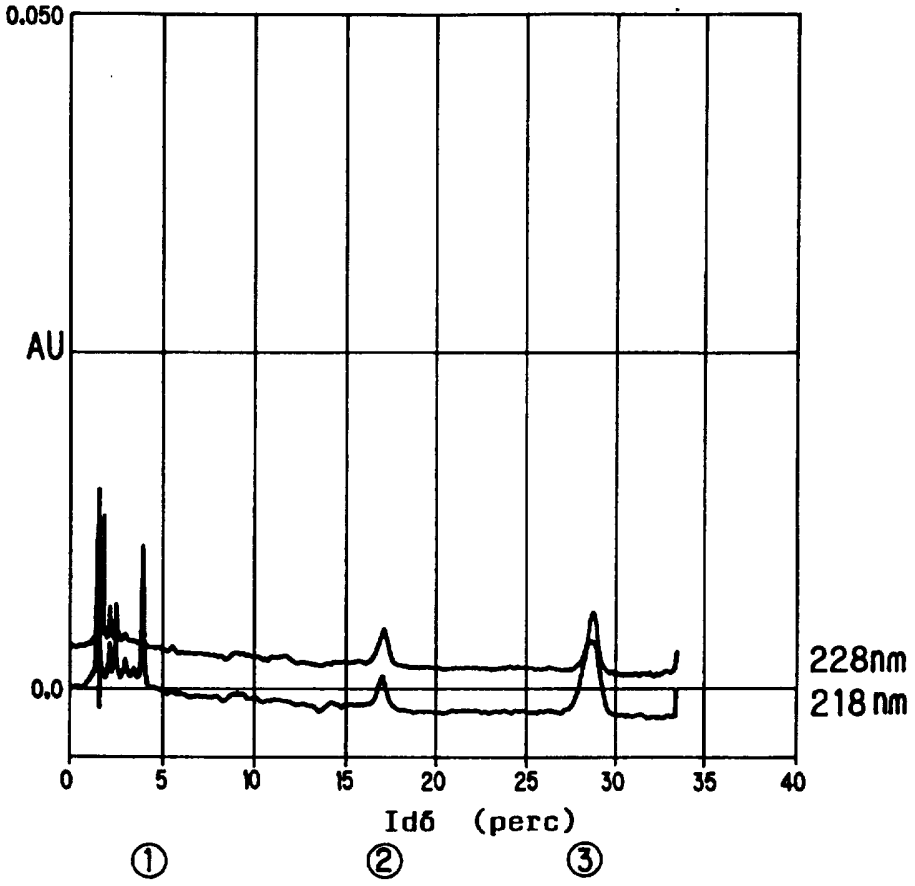
4. ábra


100.000
Rel.AU
0.0
④
②
③
①
200
240
280
320
360
400
Hullmáhossz (nm)

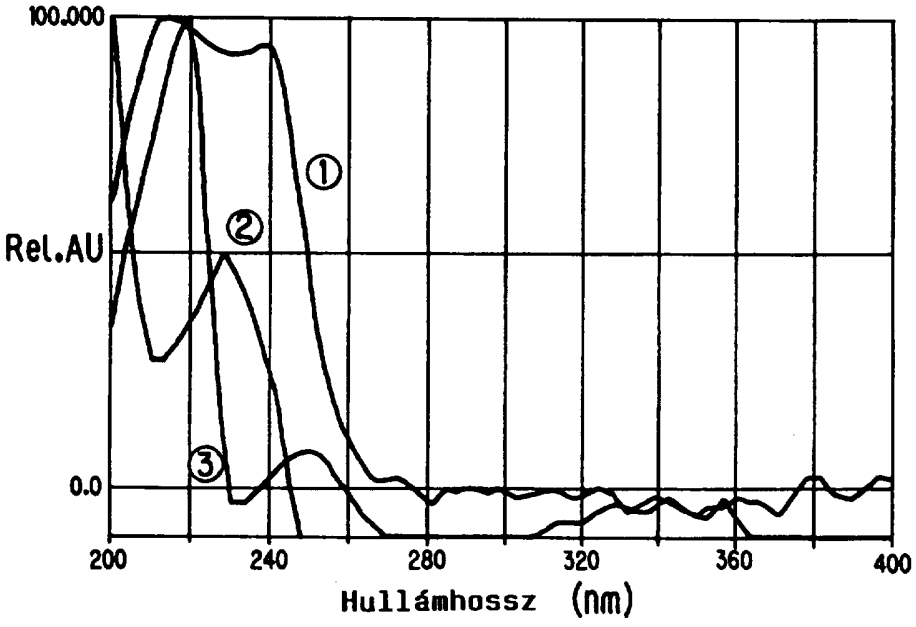
5. ábra



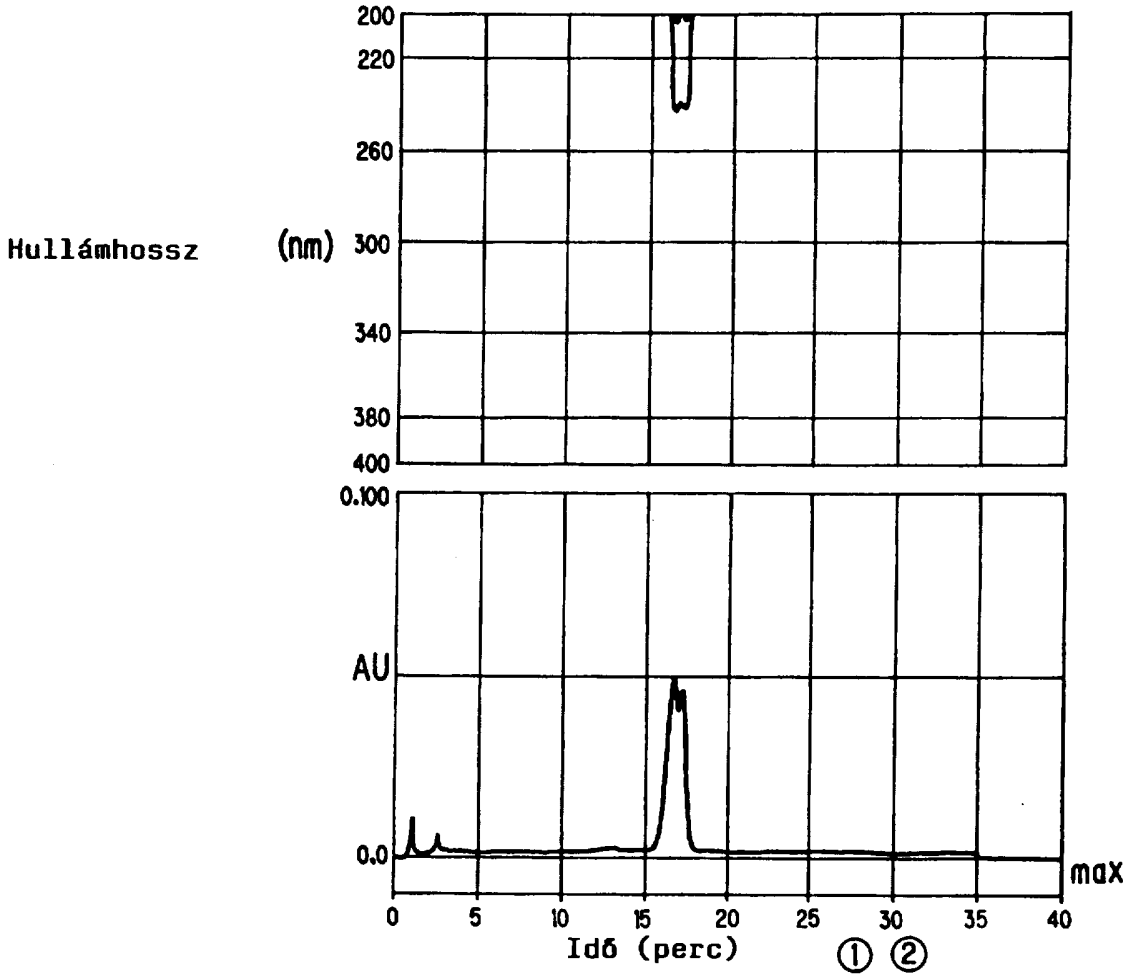
6. ábra


0.050
AU
0.0
228nm
218 nm
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Idő (perc)
①
②
③

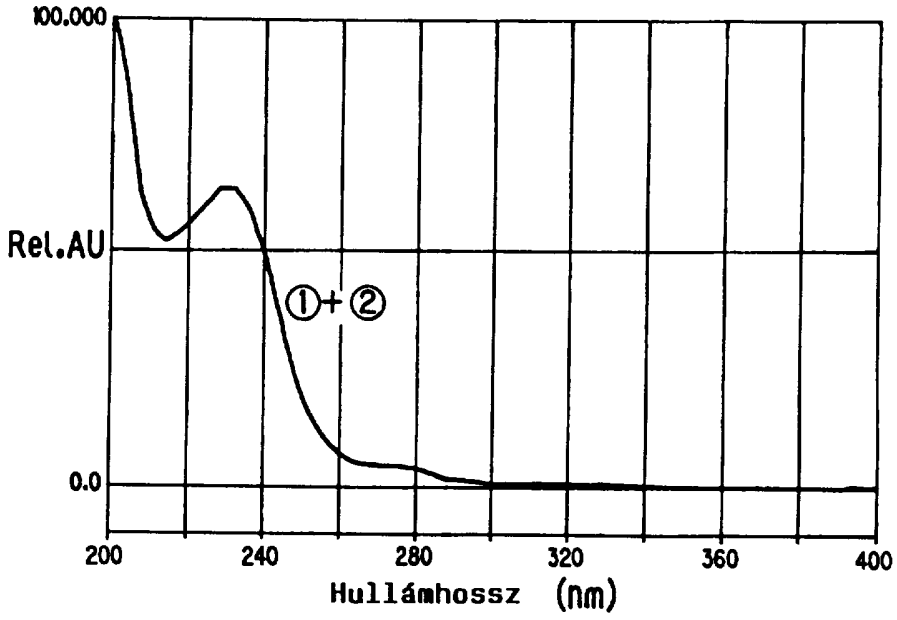
7. ábra


100.000
Rel.AU
0.0
①
②
③
200
240
280
320
360
400
Hullámhossz (nm)

8. ábra


Hullámhossz (nm)
200
220
260
300
340
380
400
0.100
AU
0.0
max
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Idő (perc)
① ②

9. ábra


100.000
Rel.AU
①+②
0.0
200
240
280
320
360
400
Hullámhossz (nm)