

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237963**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **417545**

(22) Data zgłoszenia: **13.06.2016**

(51) Int.Cl.
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(54) **Alginianowe cząstki nośnikowe kompleksu $\text{Cu}(\text{L-Arg})_2\text{H}_2\text{O}[\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$,
sposób ich wytwarzania i zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
18.12.2017 BUP 26/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.06.2021 WUP 12/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Wrocławski, Wrocław, PL
POLITECHNIKA WROCLAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA JAROMIN, Wrocław, PL
AGNIESZKA LEWIŃSKA, Wrocław, PL
AGNIESZKA WOJCIECHOWSKA, Wrocław, PL

PL 237963 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są alginianowe cząstki nośnikowe kompleksu $Cu(L-Arg)_2H_2OJC_2O_4 \cdot 5H_2O$, sposób ich wytwarzania i zastosowanie.

Preparaty do dostarczania dookreśnionego projektowane są tak, aby pozostały nienaruszone zarówno w niskim, jak i w lekko zasadowym pH (około 7) przez kilka godzin. Zakłada się, że w tym czasie przejdą one przez żołądek, jelito cienkie i dotrą do jelita grubego, w którym otoczka ulegnie dezintegracji i rozpocznie się proces uwalniania leku. Polimery stosowane w tych formach są zazwyczaj pochodnymi kwasu akrylowego lub pochodnymi celulozy, takimi jak ftalan octanu celulozy lub etyloceluloza. Pewnym ograniczeniem tego podejścia jest niepewność miejsca i środowiska, w którym otoczka zacznie ulegać degradacji. Zależnie od charakteru ruchliwości żołądkowo-jelitowej, która może się bardzo różnić u indywidualnych pacjentów i w różnych stanach chorobowych, degradacja powłoczki może zachodzić głęboko w okrężnicy lub w jelicie cienkim. Obecność kwasów tłuszczowych o krótkim łańcuchu, dwutlenku węgla i innych produktów fermentacji oraz pozostałości kwasów żółciowych często obniża pH okrężnicy do około 6. Zdolność flory okrężnicy do degradowania polimerów, które są odporne na trawienie w jelicie cienkim jest obecnie jednym z najbardziej obiecujących podejść w dookreślonym dostarczaniu leków.

Alginian to rozpuszczalny w wodzie polimer pozyskiwany z brunatnych alg, który zbudowany jest z połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym reszt kwasu α -L-guluronowego i β -D-mannuronowego. Alginian występuje w postaci soli magnezowych, barowych lub sodowych. Układ reszt kwasowych w polimerze oraz jego masa cząsteczkowa warunkują właściwości fizyczne alginianów. Zaletą alginianu jest jego nietoksyczność, silne właściwości mukoadhezyjne oraz biogodność. Wadami natomiast – niestabilna struktura oraz porowatość uzyskanych struktur, czego skutkiem są duże straty enkapsulowanej substancji leczniczej (*E. Szymańska, K. Winnicka, Mikrosfery – nowoczesna postać leku do oczu o kontrolowanym uwalnianiu, Farm Pol, 2009, 65(5): 378–386*).

Nowatorskim podejściem jest zamknięcie w alginianowych cząstkach nośnikowych liposomów z inkorporowanym związkiem z miedziowym centrum aktywnym. Liposomy to kuliste zamknięte struktury zbudowane z jednej lub kilku dwuwarstw fosfolipidowych, posiadające wewnątrz przestrzeń wodną. W zależności od właściwości substancji enkapsulowanej, może być ona zamknięta w dwuwarstwie fosfolipidowej lub w przestrzeni wodnej. Obecnie na rynku istnieje szeroka gama preparatów pozajelitowych w postaci liposomów. Zatem technologia liposomowa dostarczyła inteligentnych rozwiązań problemów występujących w farmakologii, polepszając m.in. docelowe i kontrolowane uwalnianie leku i zwiększanie jego rozpuszczalności.

Przykładem może być liposomowy antynowotworowy preparat idarubicyny ze zgłoszenia P.341123 (Odmowa udzielenia prawa wyłącznego). Zawiera on substancję aktywną zamkniętą w pęcherzykach liposomowych. W korzystnym wykonaniu skład kompozycji lipidowej wynosi: 1 część wagowa idarubicyny na 15 części wagowych lipidów. Kompozycja składników lipidowych będąca nośnikiem dla idarubicyny zawiera dimirystylofosfatydylocholinę, siarczan cholesterolu i hemibursztynian cholesterolu w stosunku molowym 6.5:2.5:1. Sposób wytwarzania preparatu liposomowego idarubicyny polega na tym, że sporządza się mieszaninę roztworów składników lipidowych, takich jak dimirystylofosfatydylocholina i hemibursztynian cholesterolu w roztworze chloroformowym oraz chlorowoderek idarubicyny i siarczan cholesterolu w roztworze metanolu. Następnie odpędza się rozpuszczalniki, a pozostałość rozpuszcza się w cykloheksanie, liofilizuje i wytrząsa z roztworem buforowym. Tak otrzymany preparat stabilizuje się poddając go ekstruzji przez membrany o średnicy porów 100 nm lub kilkakrotnie zamraża w ciekłym azocie i rozmraża w temperaturze 40°C. Można również dodać cukier stabilizujący w postaci sacharozy lub trehalozy. Liposomowy preparat idarubicyny, charakteryzuje się korzystnymi cechami z punktu widzenia zastosowań farmaceutycznych. Otrzymane liposomy są jednowarstwowe, o ujednoliconej wielkości około 130 nm, wykazują wysoką stabilność podczas przechowywania w temperaturze 4°C przez co najmniej 6 tygodni (nie wykazują zmiany wielkości wynikającej z ewentualnego wycieku substancji aktywnej ze sfery lipidowej). Kompozycja składników lipidowych będąca nośnikiem dla idarubicyny, zapewnia wysoki stopień enkapsulacji wynoszący 95%, który uzyskuje się w prosty sposób, przez wytrząsanie składników lipidowych z substancją aktywną. Z patentu PAT. 190628 natomiast znana jest liofilizowana kompozycja zawierająca trehalozę i liposomy, w których została zamknięta biologicznie aktywna substancja, charakteryzująca się tym, że biologicznie aktywna substancja jest wysoce nierozpuszczalna w wodzie, stosunek wagowy trehaloza/lipid wynosi 1,5, a trehaloza została dodana do roztworu, w którym znajdują się uformowane liposomy przed liofilizacją.

Liposomy znalazły również zastosowanie w formulacjach kosmetycznych i farmaceutycznych. W patencie PAT. 222738 zastosowano je do kompozycji do stosowania miejscowego zawierającej heparynę, lewomentol i diosminę. Sposób otrzymywania takiej kompozycji do stosowania miejscowego w formie żelu polega na tym, że do alkoholu, w którym rozpuszczono konserwanty, wprowadza się fosfatydylocholinę i lewomentol oraz kompozycję zapachową, a następnie miesza się z nim stabilizator i heparynę rozpuszczone w wodzie, po dokładnym uwodnieniu fazy organicznej, dodaje się następnie diosminę, całość homogenizując, w następnym etapie dodaje się substancję żelującą i ponownie całość homogenizuje się, na koniec dodaje się regulator pH, całość dokładnie miesza i odpowietrza. Natomiast w zgłoszeniu P.402511 (Odmowa udzielenia prawa wyłącznego) przedmiotem wynalazku jest żel liposomowy zawierający substancję aktywną – nizynę, z przeznaczeniem do stosowania jako dermatologiczny produkt leczniczy lub kosmetyk w celu prewencji lub leczenia infekcji skórnych oraz sposób jego wytwarzania. W skład preparatu wchodzi liposomy, które służą, jako rozpuszczalnik dla nizyny, zwiększając jej dostępność biologiczną. Preparat zawiera nizynę, lipidy, środki konserwujące, bufor oraz środek żelujący. Wynalazek obejmuje także sposób wytwarzania preparatu zawierającego agregaty lipidowe z nizyną, na który składają się sekwencyjne procesy rozpuszczania i mieszania gwarantujące, że wszystkie roztwory, do momentu formowania liposomów, są roztworami właściwymi. Końcowym etapem wytwarzania preparatu jest proces ekstruzji, tzn. przeciskania agregatów lipidowych przez filtry poliwęglowe, w celu uzyskania jednorodnych pod względem rozmiaru liposomów.

Znane są również wynalazki opisujące kontrolowane uwalnianie substancji czynnych. Zgłoszenie P.399579 prezentuje wynalazek, jakim jest system zębodołowy do miejscowego i kontrolowanego uwalniania substancji czynnych i wykonanie takiej postaci leku. System składa się z dwóch warstw, każda złożona z innego polimeru. System może być stosowany w przypadku powikłania poekstrakcyjnego zęba, suchego zębodołu lub uszkodzonych tkanek przyzębia. Do wykonania systemu został użyty mikrokrystaliczny chitozan, polimer naturalny w formie hydrożelowej zawiesiny wodnej. W warstwie zewnętrznej zastosowano hydroksypropylometylocelulozę, hialuronian sodu bądź alginian sodu.

Odrębnym aspektem niniejszego wynalazku są alginianowe cząstki nośnikowe. Niniejszy układ dostarczania dookreślonego zawiera rdzeń i powłoczkę. Rdzeń zawiera związek z miedziowym centrum aktywnym, zamknięty w liposomach, bądź w formie wolnej w połączeniu z materiałem nośnikowym, jakim jest biodegradowalny polimer, np. alginian. Materiał nośnikowy ma właściwość pęcznienia w środowisku wodnym, jakie znajduje się w przewodzie pokarmowym. Z tego powodu rdzeń ma zasadniczą właściwość zdolności absorbowania dużej ilości wody i znacznego spęcznienia. Tym niemniej rdzeń ma też zasadniczą właściwość ulegania dezintegracji po uszkodzeniu powłoczki. Powłoczka stosowana w wynalazku zapobiega uwalnianiu leku przed czasem z góry ustalonym, umożliwia wniknięcie roztworu wodnego do rdzenia i pozwala na kontrolowane uwalnianie związku. Rdzeń pęcznieje, ulega dezintegracji uwalniając w ten sposób zamknięty w nim związek. Użyteczne polimery obejmują, nie ograniczając zakresu, sole metalu i polisacharydu, takiego jak pektynian wapnia albo alginian wapnia, lub mocno usieciowany polisacharyd taki jak aldehyd glutarowy sieciowany z żywicą guarową, pektyną, kwasem alginowym lub inną żywicą roślinną. W korzystnych przykładach praktycznej realizacji polimerem jest alginian wapnia lub sodu. Użyteczne środki mające zastosowanie do tworzenia otoczki obejmują, nie ograniczając zakresu, celulozę i jej pochodne. Użyteczny lipid wchodzący w skład liposomów obejmuje, nie ograniczając zakresu, fosfatydylocholinę sojową.

Wynalazek membran barierowych ze zgłoszenia P.370052 (Odmowa udzielenia prawa wyłącznego) ma zastosowanie w produkcji błon przeznaczonych dla sterowanej regeneracji tkanek i sterowanej regeneracji kości w chirurgii stomatologicznej, chirurgii szczękowo-twarzowej, periodontologii, a zwłaszcza w implantologii stomatologicznej. Sposób wykonywania membran barierowych chitozanolowo-alginianowych charakteryzuje się tym, że na nieprzywierającą płytkę wylewa się 2 g 3% hydrożelu alginianu sodu, który sieciuje się nasyconym roztworem chlorku wapnia (CaCl_2), odpłukiwanym wodą destylowaną i następnie suszy się w temperaturze nieprzekraczającej 25°C do osiągnięcia makroskopowo suchej membrany, następnie mieszaninę składającą się z mikrokrystalicznego chitozanu w ilości 2 g w postaci 3% hydrożelu, około 0,03 g glicerolu lub glikolu propylenowego oraz 4 ml wody destylowanej po wymieszaniu wylewa się na wyschniętą warstwę alginianową i suszy w temperaturze nieprzekraczającej 25°C do osiągnięcia makroskopowo suchej membrany, ostatnią warstwę alginianową wylewa się na suchą warstwę chitozanową, sieciuje CaCl_2 , odpłukiwanym wodą destylowaną i suszy jak poprzednio. Membrana barierowa jest znamienna tym, że stanowi ją sucha pozostałość alginianu, chitozanu i glicerolu lub glikolu propylenowego, przy czym alginian wagowo stanowi zawar-

tość około 70% a chitozan 30% mieszaniny. Membrana może zawierać niesteroidowy lek przeciwwzrostowy, antybiotyki lub czynniki wzrostu.

Z patentu PAT. 189352 znane są makrocząstki alginianowe o działaniu przeciwartrytmicznym składające się z lepszczu-alginianu sodowego w ilości 0,71–0,78 części wagowych, substancji hydrofilizującej (Tween 60) w ilości 0,24–0,26 części wagowych, chinidyny zasady zaadsorbowanej na skrobi ziemniaczanej w ilości 3,8–4,2 części wagowych, przy czym skrobia występuje tu w ilości 2,9–3,1 części wagowych, a w chinidynie zasada w ilości 0,935–1,075 części wagowych. Sposób otrzymywania nowych makrocząstek polega na tym, że alginian sodowy w ilości 0,71–0,78 części wagowych przetwarza się na kleik w 21,5 częściach objętościowych wody, po czym do powstałego kleiku dodaje się substancję hydrofilizującą – monostearynian polioksyetyleno 20-sorbitanu w ilości 0,24–0,26 części wagowych oraz 3,8–4,2 części wagowych utartej skrobi ziemniaczanej z zaadsorbowaną na niej chinidyną zasadą, po czym schłodzoną zawiesinę i ostudzoną do temperatury pokojowej rozcieńcza się wodą w ilości 0,5 części objętościowych i kropli się na powierzchnię cieczy desolwatacyjnej w ilości 150 części objętościowych, po upływie około 0,5 godziny, makrocząstki odcedza się i suszy w temperaturze pokojowej.

Xing i współpracownicy wskazali na zastosowanie dookrężniczego systemu dostarczania leków w polepszeniu biodostępności białek i peptydów podawanych drogą doustną. Innowacyjna formuła dedykowana do podawania doustnego składająca się z powlekanych mikrosfer alginianowych zawierających liposomy z peptydem z jadku pszczelego, jako modelowym związkiem została przebadana *in vitro* pod kątem użyteczności w dostarczaniu dookrężniczym. Badania nad uwalnianiem tej modelowej substancji aktywnej w warunkach zbliżonych do przemieszczania się w układzie pokarmowym od żołądka do okrężnicy potwierdziły, iż związek nie został uwolniony z nośnika w żołądku i jelicie cienkim. Szybkość uwalniania peptydu z liposomów inkorporowanych w powleczone mikrosfery alginianowe zależna była od stężenia alginianu wapnia, ilości peptydu w liposomach, a także obecności otoczki na powierzchni alginianu. Bardziej zaawansowane badania z użyciem gamma scyntygrafii *in vivo* pozwoliły na oszacowanie czasu dotarcia podawanej formy do okrężnicy w granicach 4–5 godzin (Xing L, Dawei C, Liping X, Rongqing Z, *Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome*, *J Control Release* 2003 93(3) 293–300).

Istotą wynalazku są alginianowe cząstki nośnikowe zawierające w matrycy związek o wzorze $Cu(L-Arg)_2H_2O]C_2O_4 \cdot 5H_2O$ enkapsulowany w liposomach lub w formie wolnej.

Nośniki według wynalazku charakteryzują się tym że, z kompleksu heksa hydrat szczawianu [akwa(di(2-amino-5-guanidynopentano))miedzi(II)] jedną częścią molową uwodnionej soli chlorku miedzi (II) lub soli siarczanu(VI) miedzi(II) lub soli azotanu(V) miedzi(II) rozpuszcza się w wodzie i poddaje się reakcji z dwiema częściami molowymi roztworu kwasu 2-amino-5-guanidynopentanowego oraz jedną część molową roztworu soli siarczanu sodu, przy czym reakcję prowadzi się na mieszadle magnetycznym przy ciągłym mieszaniu, po czym po minimum 7–18 dniach otrzymuje się krystaliczną formę kompleksu heksa hydrat szczawianu [akwa(di(2-amino-5-guanidynopentano))miedzi(II)] a stosunek molowy reagentów $Cu^{2+} : L-Arg : Na_2C_2O_4$ stosuje się 1:2:1.

Istota sposobu wytwarzania polega na zamykaniu liposomów z inkorporowanym związkiem z miedziowym centrum aktywnym lub wolnego związku w alginianie, charakteryzuje się według wynalazku tym, że przygotowaną zawiesinę liposomów lub wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym, o określonym stężeniu miesza się z wodną zawiesiną alginianu i tak przygotowaną mieszaninę wkrapla się do $CaCl_2$ lub $CaCl_2$ zawierającego hydroksypropylometylocelulozę i delikatnie miesza w temperaturze pokojowej. Otrzymane w ten sposób alginianowe cząstki nośnikowe pozostawia się w roztworze $CaCl_2$ lub $CaCl_2$ zawierającego hydroksypropylometylocelulozę, a następnie oddziela się od roztworu na drodze filtracji, przemywa się wodą destylowaną i pozostawia do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Sposób według wynalazku polega na tym, że jako lipid stosuje się fosfatydylocholinę sojową lub inny lipid pochodzenia naturalnego.

Sposób według wynalazku polega na tym, że liposomy tworzone są z 20–50 mg lecytyny, uwadniane 1,5–5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym, korzystnie o stężeniu 1,5–2,5 mg/ml.

Sposób według wynalazku polega na tym, że zawiesina liposomowa przepychana jest przez filtry poliwęglanowe o zdefiniowanych porach, korzystnie 100–400 nm.

Sposób według wynalazku polega na tym, że zawiesinę liposomów, zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin, a następnie uwadnia się 2–3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji.

Sposób według wynalazku polega na tym, że mieszanina zostaje wkroplona do 100 ml 3 lub 5% w/v CaCl_2 lub 3 lub 5% w/v CaCl_2 zawierającego 0,08 lub 0,1% w/v hydroksypropylometylocelulozę i delikatnie wymieszana w temperaturze pokojowej.

Sposób według wynalazku polega na tym, że otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostawione zostają w roztworze CaCl_2 lub CaCl_2 zawierającego hydroksypropylometylocelulozę przez godzinę, następnie zostają oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Istotą wynalazku jest zastosowanie alginianowych nośników kompleksu $\text{Cu(L-Arg)}_2\text{H}_2\text{O}[\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$.

Wynalazek stanowią liposomowe formułacje związku z miedziowym centrum aktywnym o wzorze (1) inkorporowane w biodegradowalny polimer pochodzący z alg, powleczone celulozą i jej pochodnymi. Liposomy zbudowane są z lipidów pochodzenia naturalnego korzystnie z fosfatydylocholiny. Liposomy tworzone są z 20–50 mg lecytyny, np. sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 1,5–5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym, korzystnie o stężeniu 1,5–2,5 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe o zdefiniowanych porach, korzystnie 100–400 nm, otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 2–3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelą Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm.

Wynalazkiem jest sposób zamykania liposomów z inkorporowanym związkiem z miedziowym centrum aktywnym lub wolnego związku w alginianie. Przygotowana zawiesina liposomów lub wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym korzystnie o stężeniu 1,5–2,5 mg/ml zmieszano z wodną zawiesiną alginianu, otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl_2 lub 5% w/v CaCl_2 zawierającego hydroksypropylometylocelulozę i delikatnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostawiono w roztworze CaCl_2 lub CaCl_2 zawierającego hydroksypropylometylocelulozę przez godzinę. Po upływie 30 minut, otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Otrzymane metodą według wynalazku układy mogą stanowić potencjalny nośnik związków z centrum metaloaktywnym słabo rozpuszczalnych w wodzie. Metoda wytwarzania nie wymaga użycia specjalistycznych, dedykowanych urządzeń. Otrzymane liposomy charakteryzują się jednorodnością i homogennością, a alginianowe cząstki nośnikowe dodatkowo wysoką stabilnością termiczną i zdolnością do ochrony przed uwalnianiem zamkniętego związku w początkowych odcinkach układu pokarmowego. Poza tym układy wytwarzane metodą według wynalazku mogą służyć do solubilizowania składników aktywnych.

Alginianowe cząstki nośnikowe, które są przedmiotem wynalazku, zostały scharakteryzowane pod względem morfologii powierzchni. **Rys. 1.** przedstawia obrazowanie metodą SEM (*skaningowy mikroskop elektronowy*), morfologii powierzchni alginianowych cząstek nośnikowych bez powłoki (zdjęcie górne) i z powłoką hydroksypropylometylocelulozy na powierzchni, (zdjęcie dolne), dla wyjściowych układów liposomowych wyznaczono parametry takie jak: średnica hydrodynamiczna liposomów – D_H , współczynnik polidispersyjności PdI, potencjał Zeta, które przedstawiono w Tab. 1.

T a b e l a 1

Przykładowe parametry dla liposomów zbudowanych z fosfatydylocholiny sojowej (średnica hydrodynamiczna liposomów – D_H , współczynnik polidispersyjności – PdI).

DH [nm]	PdI	Potencjał Zeta [mV]
123,7 ± 0,9	0,17 ± 0,01	– 4,3 ± 0.5

Na Rys. 2 zamieszczono obrazowanie liposomów z enkapsulowanym związkiem, natomiast na Rys. 3. znajduje się analiza XRD potwierdzająca enkapsulację związku z aktywnym centrum miedziowym, wyniki te uzyskano z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

W literaturze przedmiotu nie są znane tego typu połączenia związku z miedziowym centrum aktywnym i polimerów naturalnych typu alginian lub pektynian w formie wolnej lub zamkniętej w liposomach. Sposób wytwarzania odznacza się dużą powtarzalnością i pozwala na zamknięcie ponad 20% wprowadzonego związku w formie liposomów do alginianowych cząstek nośnikowych (Tab. 2).

Tabela 2

Skład przykładowych, wyjściowych formułacji związku z aktywnym centrum miedziowym i jego wydajność zamykania w alginianowych cząstkach nośnikowych.

Stężenie alginianu [% w/w]	Forma podania związku † do alginianu		Powlekanie hydroksypropylometylocelulozą	Wydajność zamykania [%]
	roztwór wodny	w formie liposomów		
2	+	-	-	2,04
2	-	+	+	5,1
2	+	-	-	17,2
2	-	+	+	23,3
2	-	-	-	-
2	-	-	+	-

Zaletą alginianowych cząstek nośnikowych według wynalazku jest wysoka stabilność, wysoka homogeniczność produktu końcowego, zdolność do solubilizacji oraz efektywność działania znajdujących się w nich składników aktywnych, które stosunkowo łatwo można wprowadzać poprzez stosowanie liposomów. Układy te mogą stanowić bardzo dobrą formułę bazową dla wielu zastosowań farmaceutycznych. Zastosowanie na powierzchni powłoki z hydroksypropylometylocelulozy, dodatkowo chroni przed przedwczesnym wyciekami substancji zamkniętej. Jej obecność, jak również zawartość we wnętrzu alginianowych cząstek nośnikowych liposomów wydatnie zwiększa także wydajność zamykania.

Zasadniczą zaletą według wynalazku jest wytwarzanie bardzo dogodną metodą, bez konieczności stosowania wysoko wyspecjalizowanych urządzeń, jednorodnych alginianowych cząstek nośnikowych, które mogą stanowić przykład nowoczesnych nośników substancji biologicznie czynnych.

Niżej podane przykłady ilustrują niniejszy opis wynalazku i nie powinny być uznane za ograniczające zakres ochrony patentowej.

Przykład I

Wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl₂ zawierającego 0,1% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl₂ przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład II

Wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:3 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl₂ zawierającego 0,1% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe po-

zostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład III

Wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 3% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl_2 zawierającego 0,1% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład IV

Wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 3% w/v CaCl_2 zawierającego 0,1 hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład V

Wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl_2 zawierającego 0,08% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład VI

Liposomy utworzone zostały z 50 mg lecytyny sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe o porach 100 nm, otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelom Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm. Otrzymano w ten sposób liposomy, których rozmiar, określony przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*) wynosił 130,6 nm, a współczynnik polidispersyjności (Pdl) 0,198.

Zawiesinę liposomów zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl_2 i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład VII

Liposomy utworzone zostały z 50 mg lecytyny sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 3,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe o porach 400 nm, a następnie 100 nm otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 2 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku

od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelem Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm. Otrzymano w ten sposób liposomy, których rozmiar, określony przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*) wynosił 130,2 nm, a współczynnik polidispersyjności (Pdl) 0,241.

Zawiesinę liposomów zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:5 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl₂ i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl₂ przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład VIII

Liposomy utworzone zostały z 30 mg lecytyny sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 3,0 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe o porach 100 nm, otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelem Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm. Otrzymano w ten sposób liposomy, których rozmiar, określony przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*) wynosił 132,4 nm, a współczynnik polidispersyjności (Pdl) 0,232.

Otrzymaną zawiesinę liposomów zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl₂ i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl₂ przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład IX

Liposomy utworzone zostały z 50 mg lecytyny sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe o porach 100 nm, otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelem Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm. Otrzymano w ten sposób liposomy, których rozmiar, określony przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*) wynosił 125,0 nm, a współczynnik polidispersyjności (Pdl) 0,166.

Zawiesinę liposomów zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl₂ zawierającego 0,08% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl₂ przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład X

Liposomy utworzone zostały z 50 mg lecytyny sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 3,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 2,5 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe o porach 400 nm, a następnie

100 nm otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 2 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelom Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm. Otrzymano w ten sposób liposomy, których rozmiar, określony przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*) wynosił 123,6 nm, a współczynnik polidispersyjności (Pdl) 0,190.

Zawiesinę liposomów zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl_2 zawierającego 0,1% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Przykład XI

Liposomy utworzone zostały z 30 mg lecytyny sojowej, która rozpuszczona została w chloroformie, a następnie po odparowaniu rozpuszczalnika utworzyła suchy film lipidowy na powierzchni kolbki. Następnie dodano 5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym o stężeniu 3,0 mg/ml w celu uwodnienia lipidów i utworzenia wielowarstwowych liposomów typu MLV (multilamellar vesicles). Następnie przeprowadzono etap ekstruzji polegający na 21-krotnym przepychaniu otrzymanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowi o porach 100 nm, otrzymując zawiesinę liposomów, którą zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin. Otrzymaną pozostałość uwadnia się 3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji. Końcowy etap obejmuje proces oddzielenia niezamkniętego związku od liposomów. Przeprowadza się go wykorzystując technikę sączenia molekularnego z użyciem kolumny wypełnionej żelom Sephadex G-50 fine, korzystnie o wymiarach 1,5 x 20 cm. Otrzymano w ten sposób liposomy, których rozmiar, określony przy pomocy techniki dynamicznego rozpraszania światła (*Dynamic Light Scattering*) wynosił 122,7 nm, a współczynnik polidispersyjności (Pdl) 0,155.

Otrzymaną zawiesinę liposomów zmieszano z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:4 w/w otrzymując 2% w/w alginian. Mieszanina została następnie wkroplona do 100 ml 5% w/v CaCl_2 zawierającego 0,08% hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie wymieszana w temperaturze pokojowej. Otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostały w roztworze CaCl_2 przez godzinę. Następnie zostały oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

Zastrzeżenia patentowe

1. Alginianowe sferyczne cząstki nośnikowe zawierające w matrycy z materiału biopolimerowego na bazie soli alginianowych substancję czynną, **znamiennie tym**, że substancją czynną jest kompleks o wzorze $\text{Cu}(\text{L-Arg})_2\text{H}_2\text{O}]\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, w formie enkapsulowanej w liposomach lub w formie wolnej, a sfery mogą być ewentualnie powleczone warstwą celulozy, korzystnie hydroksypropylometylocelulozy.
2. Sposób wytwarzania alginianowych cząstek nośnikowych zawierających w matrycy z materiału biopolimerowego na bazie soli alginianowych substancję czynną o wzorze $\text{Cu}(\text{L-Arg})_2\text{H}_2\text{O}]\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. W formie enkapsulowanej w liposomach lub w formie wolnej, gdzie cząstki są ewentualnie powleczone warstwą hydroksypropylometylocelulozy, polegający na zamykaniu liposomów z inkorporowanym związkiem aktywnym $\text{Cu}(\text{L-Arg})_2\text{H}_2\text{O}]\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ lub wolnego związku $\text{Cu}(\text{L-Arg})_2\text{H}_2\text{O}]\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ w alginianie, gdzie przygotowaną zawiesinę liposomów lub wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym o określonym stężeniu miesza się z wodną zawiesiną alginianu i tak przygotowaną mieszaninę wkrapla się do CaCl_2 lub CaCl_2 zawierającego hydroksypropylometylocelulozę i dokładnie miesza w temperaturze pokojowej, otrzymane w ten sposób cząstki pozostawia się w roztworze CaCl_2 lub CaCl_2 zawierającego hydroksypropylometylocelulozę, następnie oddziela się od roztworu na drodze filtracji, przemywa wodą destylowaną i pozostawia do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako lipid stosuje się fosfatydylocholinę sojową lub inny lipid pochodzenia naturalnego.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że liposomy tworzone są z 20–50 mg lecytyny, uwadniane 1,5–5,0 ml wodnego roztworu związku z miedziowym centrum aktywnym, korzystnie o stężeniu 1,5–2,5 mg/ml.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zawiesina liposomowa przepychana jest przez filtry poliwęglanowe o zdefiniowanych porach, korzystnie 100–400 nm.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zawiesinę liposomów zamraża się w ciekłym azocie i liofilizuje, korzystnie 12–24 godzin, a następnie uwadnia się 2–3 ml wody destylowanej, miesza i ponownie przeprowadza etap ekstruzji.
7. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zawiesinę liposomów lub wodny roztwór związku z miedziowym centrum aktywnym, miesza się z wodną zawiesiną alginianu w stosunku 1:3. 1:4 lub 1:5 w/w, otrzymując 2 lub 3% w/w alginian.
8. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że mieszanina z zastrz. 5 zostaje wkroplona do 100 ml 3 lub 5% w/v CaCl_2 lub 3 lub 5% w/v CaCl_2 zawierającego 0,08 lub 0,1% w/v hydroksypropylometylocelulozę i delikatnie wymieszana w temperaturze pokojowej.
9. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że otrzymane alginianowe cząstki nośnikowe pozostawione zostają w roztworze CaCl_2 lub CaCl_2 zawierającego hydroksypropylometylocelulozę przez godzinę, następnie zostają oddzielone od roztworu na drodze filtracji, przemyte wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin.
10. Zastosowanie soli alginianowych do wytworzenia cząstek nośnikowych zawierających kompleks o wzorze $\text{Cu}(\text{L-Arg})_2\text{H}_2\text{O}[\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$.