

Akademia Medyczna w Gdańsku
Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej

Małgorzata Klunder

NOWA DOŻYLNNA POSTAĆ LEKU Z PAKLITAKSELEM

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska

Rozprawa doktorska przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
w celu nadania stopnia
doktora nauk farmaceutycznych

Praca wykonana w ramach grantu KBN 3 PO5F 022 25

GDAŃSK 2007

STRESZCZENIE	5
SUMMARY	9
I. WSTĘP	12
1. PAKLITAKSEL - CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI	13
2. PAKLITAKSEL - DROGA I SPOSÓB PODAWANIA, POSTACIE LEKU STOSOWANE W LECZNICTWIE, TOKSYCZNOŚĆ	17
3. CREMOPHOR EL - CHARAKTERYSTYKA I TOKSYCZNOŚĆ SUBSTANCJI	20
4. ALTERNATYWNE POSTACIE LEKU DLA PAKLITAKSELU	22
5. SOLUBILIZACJA SUBSTANCJI LECZNICZEJ W CELU PODANIA DOŻYLNEGO - WYMAGANIA I METODY	27
6. LECYTyna JAKO SUBSTANCJA POMOCNICZA W LEKACH POZAJELITOWYCH ORAZ WODNE DYSERSJE LECYTyny (WDL)	31
II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY	41
III. METODYKA	44
1. ODCZYNNIKI, MATERIAŁY I APARATURA	45
1.1. Odczynnik i rozpuszczalniki	45
1.2. Materiały	46
1.3. Aparatura	47
2. OTRZYMYWANIE AMORFICZNEJ POSTACI PAKLITAKSELU	49
3. SPORZĄDZANIE WODNYCH DYSERSJI LECYTyny (WDL)	50
4. SPORZĄDZANIE MIESZANYCH MICELI SKŁADAJĄCYCH SIĘ Z LECYTyny JAJOWEJ ORAZ DEOKSYCHOLANU SODU	51
5. SPORZĄDZANIE NOŚNIKA Z LECYTynĄ JAJOWĄ ORAZ SPANEM	52
6. WSPÓŁLIOFILIZACJA PAKLITAKSELU Z SUBSTANCJAMI POMOCNICZYMI .	52
6.1. Przygotowanie układów współliofilizowanych	52
6.2. Wielokrotna liofilizacja	52

7. BADANIE ROZPUSZCZALNOŚCI PAKLITAKSELU W NOŚNIKACH	53
7.1. Badanie rozpuszczalności paklitakselu amorficznego i krystalicznego	53
7.1.1. Nośniki nieliofilizowane	54
7.1.2. Nośniki liofilizowane	54
7.2. Badanie rozpuszczalności paklitakselu współliofilizowanego z substancjami pomocniczymi oraz wielokrotna współliofilizacja	54
7.3. Pobieranie i przygotowanie prób do analizy	55
7.4. Ocena wizualna oraz obserwacje mikroskopowe	55
8. ANALIZA ILOŚCIOWA PAKLITAKSELU	55
9. CHARAKTERYSTYKA WODNYCH DISPERSJI LECYTyny I FOSFOLIPIDÓW	56
9.1. Pomiar pH	56
9.2. Pomiar wielkości cząstek w WDL	56
9.3. Pomiar absorpcji	57
9.4. Ocena wizualna oraz obserwacje mikroskopowe	57
9.5. Wirowanie	57
9.6. Analiza ESR	57
10. BADANIA <i>IN VIVO</i> NA KRÓLIKACH - OCENA WPŁYWU NOŚNIKA NA FARMAKOKINETYKĘ PAKLITAKSELU, OBSERWACJA ZACHOWANIA ZWIERZĄT, BADANIE TOLERANCJI MIEJSCOWEJ PREPARATU	58
10.1. Przygotowanie preparatów do badania <i>in vivo</i>	58
10.2. Przygotowanie zwierząt doświadczalnych	58
10.3. Aplikacja preparatów, obserwacje, pobieranie materiału do badań	59
10.4. Badanie histopatologiczne uszu królików	59
10.5. Oznaczanie stężenia paklitakselu w osoczu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)	60
10.5.1. Walidacja metody	60
11. BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ NA MYSZACH	61
11.1. Przygotowanie preparatów do badania toksyczności ostrej	61
11.2. Przygotowanie zwierząt doświadczalnych	61
11.3. Aplikacja preparatów i obserwacje	61

IV. WYNIKI.....	63
1. AMORFICZNA FORMA PAKLITAKSELU	64
2. ROZPUSZCZALNOŚĆ PAKLITAKSELU W WODNYCH DYSERSJACH LECYTINY I W UKŁADACH Z DODATKIEM INNYCH SUBSTANCJI.....	65
3. CHARAKTERYSTYKA WODNYCH DYSERSJI LECYTINY	75
4. ANALIZA ESR	86
5. BADANIA <i>IN VIVO</i> NA KRÓLIKACH.....	88
6. BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ NA MYSZACH	91
V. OMÓWIENIE WYNIKÓW	93
VI. WNIOSKI	106
VII. PIŚMIENNICTWO	108
VIII. ZAŁĄCZNIKI.....	117

STRESZCZENIE
SUMMARY

Od momentu odkrycia paklitakselu trwają poszukiwania jak najlepszego nośnika dla tej substancji. Paklitaksel wymaga podania dożylnie, we wlewie, tymczasem praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie, dlatego w celu uzyskania postaci odpowiedniej do podania pacjentowi należy użyć substancji pomocniczych o charakterze solubilizatorów. Układ musi cechować się odpowiednią trwałością. Wadą preparatu oryginalnego Taxol jest wysoka toksyczność spowodowana obecnością nie tylko substancji leczniczej, ale głównej substancji pomocniczej - Cremophoru EL wywołującego u pacjentów reakcje uczuleniowe oraz neuropatię. Paklitaksel ulega rozpuszczeniu w obecności wielu innych substancji powierzchniowo czynnych i współrozpuszczalników, jednak nie mogą być one podawane dożylnie. Celem pracy było otrzymanie nowej, alternatywnej do oryginalnej, postaci leku z paklitakselem przeznaczonej do podania we wlewie dożylnym. W przeprowadzonych badaniach jako podstawowy nośnik dla substancji wybrano wodne dyspersje lecytyny (WDL), które jak do tej pory nie zostały wykorzystane w leczeniu jako rozpuszczalnik substancji leczniczych. W Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej już od kilku lat trwają badania nad właściwościami tych układów i zastosowaniem WDL do solubilizacji nierozpuszczalnych w wodzie substancji leczniczych. Główną zaletą WDL jest biogodność oraz prosta technologia ich sporządzania. Pozostałe substancje pomocnicze, które wchodziły w skład badanych układów, to związki dopuszczone do stosowania w lekach podawanych drogą pozajelitową.

Głównym przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy jest amorficzna forma paklitakselu, która w przeciwieństwie do formy krystalicznej rozpuszcza się znacznie lepiej i szybciej - w ciągu 2-5 min od połączenia substancji leczniczej z rozpuszczalnikiem uzyskać można maksymalne stężenie leku w układzie.

Dażono do osiągnięcia rozpuszczalności paklitakselu 100 mg/100 ml, gdyż lek w takim stężeniu jest podawany pacjentom. Jako podstawową substancję pomocniczą do badań wybrano lecytynę jajową i sojową, które stanowią mieszaninę fosfolipidów, a ich głównym składnikiem jest fosfatydylocholina. To powoduje, że są to biogodne i biodegradowalne substancje i możliwe jest ich stosowanie w preparatach podawanych pozajelitowo (dotychczas w postaci emulsji, liposomów oraz mieszanych miceli). Dodając do sporządzanych układów sole kwasów żółciowych otrzymywano nośniki, w których obecne były struktury określane jako mieszane micelle. Dodatkowo układy modyfikowano takimi substancjami jak: Span 80, Tween 80, Synperonic F68 (poloksamer), makrogol i chlorek benzalkoniowy. W celu dalszego zwiększenia rozpuszczalności paklitakselu stosowano proces liofilizacji - fazy dyspergującej lub roztworu solubilizowanego paklitakselu, a także wielokrotną współliofilizację. Porównano także rozpuszczalność paklitakselu amorficznego i krystalicznego w układach liofilizowanych i niepoddanych liofilizacji.

Najwyższą rozpuszczalność uzyskano w układzie składającym się z amorficznego paklitakselu i lecytyny sojowej (5%) - 580 mg/100 ml, jednak w trakcie 24 h wytrąsania

dochodziło do znacznego zmniejszenia stężenia rozpuszczonej substancji leczniczej (103 mg/100 ml). Podobną rozpuszczalność, ale znacznie lepszą trwałość fizyczną obserwowano w analogicznym układzie zawierającym lecytynę jajową. Po 24 h stężenie rozpuszczonego paklitakselu w dyspersji wynosiło 390-550 mg/100 ml.

Dobrą rozpuszczalność paklitakselu w jajowej WDL potwierdzono stosując lecytynę z różnych serii produkcyjnych. Etap homogenizacji wysokociśnieniowej podczas otrzymywania 5% jajowej WDL korzystnie wpłynął na trwałość roztworu amorficznego paklitakselu w tym nośniku, lecz badanie prowadzone z 5% sojową WDL nie potwierdziło tej zależności.

Rozpuszczalność amorficznego paklitakselu uległa zmniejszeniu w jajowej WDL przechowywanej przez 6 lub 18 miesięcy w temperaturze pokojowej. Nie badano rozpuszczalności w układach przechowywanych w 4 °C. Nie udało się uzyskać odpowiedniej rozpuszczalności w dyspersji lecytyny przechowywanej w postaci liofilizatu.

Najbardziej obiecujący układ zawierający mieszane micelle składał się z lecytyny sojowej 2,5% oraz deoksycholanu sodu 2,5%. Uzyskana w nim rozpuszczalność paklitakselu wynosiła 180 mg/100 ml i nie uległa zmianie przez 24 h. Dodanie innych surfaktantów oraz zastosowanie innych niż woda rozpuszczalników nie wpłynęło znacząco na rozpuszczalność paklitakselu.

W wyniku przeprowadzonych procesów współliofilizacji paklitakselu z lecytyną oraz z lecytyną i deoksycholanem sodu lub innymi surfaktantami najwyższą rozpuszczalność uzyskano w układzie składającym się z lecytyny jajowej (3%). Umożliwiał on uzyskanie rozpuszczalności leku na poziomie ok. 50 mg/100 ml. Analogiczny układ zawierający lecytynę sojową zwiększył rozpuszczalność substancji leczniczej w niewystarczającym stopniu.

Podjęto również badanie służące dalszej ocenie właściwości fizykochemicznych wodnych dyspersji lecytyny jajowej oraz sojowej. Układy oceniano wizualnie oraz pod mikroskopem optycznym, badano ich pH oraz wielkość cząstek. W celu stwierdzenia wpływu homogenizacji i substancji pomocniczych na powstawanie różnych struktur fosfolipidowych zastosowano technikę ESR.

W wyjałowionej dyspersji lecytyny jajowej większość cząstek mieściła się w zakresie $<2\ \mu\text{m}$ (mediana $0,66\ \mu\text{m}$). W przypadku dyspersji lecytyny sojowej średnica cząstek zawierała się w zakresie $1\text{-}10\ \mu\text{m}$ (mediana $2,78\ \mu\text{m}$). W trakcie przechowywania w temperaturze pokojowej (6 miesięcy) następowały dość istotne zmiany właściwości obu dyspersji. Z użyciem dyfraktometrii laserowej obserwowano pojawianie się coraz większych aglomeratów. Obecność aglomeratów cząstek o wielkości kilkudziesięciu μm nie została potwierdzona w badaniach mikroskopowych, co wskazuje na ograniczenie techniki dyfraktometrii laserowej w pomiarach cząstek WDL. W trakcie wyjaławiania dochodziło do obniżenia pH zarówno w dyspersji lecytyny jajowej jak i sojowej do 5,8-5,9.

Wartość pH jajowej WDL ulegała niewielkiemu obniżeniu w trakcie przechowywania. Homogenizowana dyspersja cechowała się niższym początkowym pH, które spadło o ponad 1 jednostkę w czasie 18 miesięcy. W sojowej WDL, również tej poddanej homogenizacji, pH ulegało nieznacznym zmianom podczas przechowywania. Mimo pewnych zmian zachodzących w układach, badania przedstawione w niniejszej pracy wraz z doświadczeniami, które wcześniej przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej, pozwalają stwierdzić możliwość zastosowania wodnych dyspersji lecytyny jako nośników dla substancji leczniczych podawanych drogą dożylną.

Na podstawie wyników rozpuszczalności paklitakselu oraz trwałości otrzymanych układów, do badań *in vivo* wytypowano jajową WDL (5%). Królikom podawano roztwór paklitakselu w tym nośniku (100 mg/100 ml) i porównano z lekiem oryginalnym Taxol (100 mg/100 ml).

Nie zaobserwowano różnic w zachowaniu zwierząt ani po podaniu preparatów zawierających paklitaksel, ani po podaniu preparatów placebo. Nie odnotowano także zmian wizualnych w miejscu podawania leku, chociaż badania histopatologiczne wykazały zmiany, które należy jednak wiązać z techniką podawania preparatów. Zmiany biochemiczne (m. in. spadek hematokrytu, stężenia hemoglobiny, ilości erytrocytów i limfocytów), charakterystyczne również dla pacjentów otrzymujących wlew dożylny z paklitakselem, stwierdzono jedynie po podaniu preparatów z substancją leczniczą, przy czym zmiany u zwierząt otrzymujących lek oryginalny były nawet większe niż po podaniu amorficznego paklitakselu w 5% jajowej WDL. Oznaczono niższe stężenie paklitakselu we krwi po podaniu roztworu paklitakselu w WDL (śr. 290 ng/ml) niż po podaniu leku Taxol (śr. 540 ng/ml). Różnica ta, statystycznie istotna pomimo dużych rozrzutów wyników, dowodzi innej farmakokinetyki paklitakselu po podaniu w nośniku submikronowym.

Badanie toksyczności ostrej na myszach wykazało, że nowy preparat z paklitakselem może być mniej toksyczny niż lek oryginalny. Myszy otrzymujące roztwór amorficznego paklitakselu w WDL przeżywały dłużej (8-18 dawek) niż myszy otrzymujące Taxol (7-16 dawek).

Uzyskane wyniki wskazują na realną możliwość zastosowania WDL w celu solubilizacji paklitakselu, i zapewne innych substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie, w celu podania ich dożylnie. Badania *in vivo* nie wskazują na większą toksyczność nowych nośników niż stosowanych już w praktyce klinicznej. Nowa postać może zmienić kinetykę substancji, co wymaga dalszych badań. Kontynuacji wymagają również badania nad długoterminową trwałością nośnika - WDL.

Since paclitaxel was discovered there is considerable interest in the development of the most suitable carrier for that drug. Paclitaxel should be administered as an intravenous infusion but it is practically insoluble in water and the formulation suitable for parenteral administration has to contain additional surfactants. The product should have adequate stability. A high toxicity is the main disadvantage of the original product - Taxol. Toxicity is caused by the presence of the main surfactant Cremophor EL that contributes to acute hypersensitivity reactions and peripheral neuropathy. Paclitaxel is soluble in a variety of surfactants and cosolvents but they are not allowed for administration in intravenous infusions. The aim of this study was to develop a new, alternative to original, dosage form with paclitaxel for intravenous infusion. Lecithin in the form of aqueous dispersions (WDL) was chosen as the main solubilizing agent. Until now WDL are not used as carriers for drugs. In the Department of Pharmaceutical Technology physicochemical properties of lecithin based carriers and their use as solubilizers for water insoluble drugs have been investigated for several years. The main advantage of WDL is biocompatibility and noncomplicated technology of production. Other excipients used in experiments are components already used in parenteral medicines.

During experiments the main emphasis was put on the amorphous form of paclitaxel. The amorphous form of the drug dissolves better and more quickly in comparison with the crystalline one. The maximum solubility of paclitaxel was achieved 2-5 min after adding the WDL to the amorphous drug.

The aimed drug solubility was at least 100 mg/100 ml because paclitaxel is given in that concentration to patients. Egg and soya lecithins were chosen as the main excipients. Lecithin is a mixture of phospholipids with phosphatidylcholine as the leading component. For that reason lecithin is biocompatible and biodegradable substance and can be administered intravenously (so far in the form of emulsions, liposomes and mixed micelles). The addition of cholic acid salts enables to obtain mixed micelles. Mixed micelles are already in clinical use. The formulations were also modified by adding: Span 80, Tween 80, Synperonic 80 (poloxamer), macrogol and benzalkonium chloride. To receive further solubility improvement the lyophilization process of the carrier or the formulation and also the multiple lyophilization was applied. The solubility of amorphous and crystalline substance in lyophilized and non-lyophilized carriers was compared.

The highest paclitaxel solubility i.e. 580 mg/100 ml was achieved in formulations composed of amorphous drug and soya lecithin dispersion (5%), unfortunately, the concentration of dissolved drug decreased to 103 mg/100 ml when the formulation was shaken for 24 hours. Similar solubility but better stability was obtained in analogous formulation containing egg lecithin. After 24 hours the concentration of dissolved drug was still high - 390-550 mg/100 ml.

Good paclitaxel solubility was confirmed in various lecithin batches. The step of high pressure homogenization during 5% egg WDL preparation influenced favourably the stability of amorphous paclitaxel solution in that carrier but further investigations did not confirm that dependence.

The solubility of paclitaxel in egg WDL stored for 6 or 18 months in ambient temperature has changed. However, the solubility of paclitaxel in egg WDL stored at 4 °C was not examined. Satisfactory solubility in lecithin dispersion stored in the form of lyophilizate was not achieved.

The most promising mixed micellar formulation was composed of soya lecithin and sodium deoxycholate (2,5-2,5%, w/w). The solubility of paclitaxel in mixed micelles was 180 mg/100 ml and did not change during 24 h. The addition of other surfactants and use of solvents different from water did not increase sufficiently the paclitaxel solubility.

As a result of paclitaxel co-lyophilization with lecithin, lecithin and sodium deoxycholate or lecithin and other surfactants it was demonstrated that the most beneficial formulation was composed of egg lecithin 3% allowing for the solubility of the drug about 50 mg/100 ml. The analogous formulation with soya lecithin was not so efficient.

An attempt to further evaluate egg and soya WDL physicochemical properties was undertaken. The dispersions were examined visually and using optical microscope. pH values and particles diameters were also measured. EPR was used to examine the influence of excipients and homogenization process on structural phospholipid changes.

In the autoclaved egg WDL the majority of particles had a diameter $<2\ \mu\text{m}$ (median $0,66\ \mu\text{m}$). In the autoclaved soya WDL the diameter of particles was in the range $1\text{-}10\ \mu\text{m}$ (median $2,78\ \mu\text{m}$). During storage in ambient temperature (18 months) significant changes were observed. The longer the dispersions were stored the bigger agglomerates were detected by laser diffractometry. The presence of agglomerates $20\text{-}60\ \mu\text{m}$ in size was not confirmed by use of optical microscopy. This indicates that the use of laser diffractometry for the WDL particles measurement is limited. The value of pH of both egg and soya lecithin dispersions decreased during autoclaving to $5,8\text{-}5,9$ but pH of egg WDL decreased not much during storage. Homogenized egg WDL had lower pH than the non-homogenized dispersion and the value decreased by 1 unit during 18 months. pH of soya WDL, irrespective of the homogenization, changed only slightly. All results that were obtained in Department of Pharmaceutical Technology during recent years of experiments with lecithins allow to consider WDL as a suitable carrier for drugs that must be administered intravenously.

Considering solubility and stability results egg WDL (5%) was chosen for the *in vivo* studies in rabbits. The animals were given infusions with paclitaxel dissolved in that carrier (100 mg/100 ml) and the results were compared with those obtained after administration of the original drug Taxol (100 mg/100 ml).

There was no significant difference in behaviour of rabbits receiving paclitaxel or placebo. There were no visual changes in the place of drug application but the histopatological studies showed tissue changes probably connected with the administration technique. The observed biochemical changes (of haematocrit, haemoglobin concentration, number of erythrocytes and lymphocytes) were characteristic for patients receiving paclitaxel and they occurred only after administration of paclitaxel preparations. The changes were more intensive after original drug infusion than after infusion of amorphous drug in WDL. The analyzed plasma paclitaxel concentration after application of amorphous paclitaxel in WDL was lower (290 ± 182 ng/ml) than after Taxol (540 ± 262 ng/ml). This statistically important difference proves that in spite of big results scatter the pharmacokinetic of the drug in submicron carrier may be different.

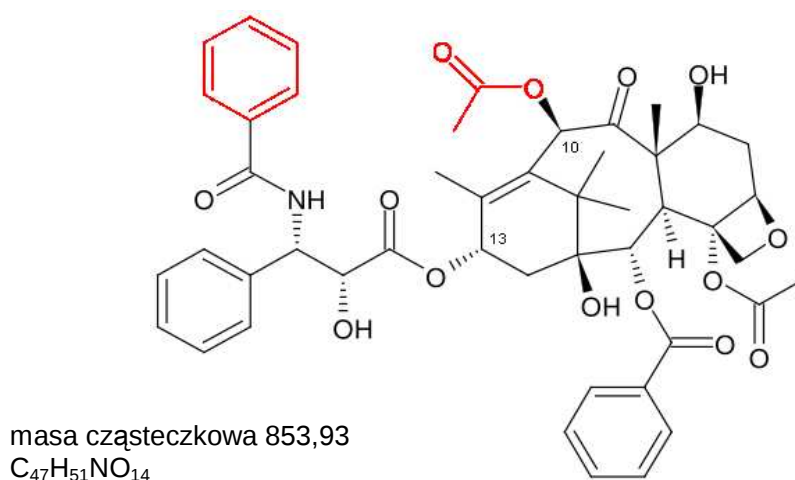
In the acute toxicity studies on mice the new dosage form with paclitaxel was similarly or even less toxic than the original drug. The mice injected intraperitoneally with paclitaxel in WDL survived longer (8-18 doses) than mice receiving *Taxol* (7-16 doses).

All obtained results indicate there is a real chance for the use of WDL to solubilize paclitaxel and probably also other substances with poor water solubility in order to enable their intravenous administration. *In vivo* experiments did not show the higher toxicity of the new carriers in comparison with the formulations already used in clinical practice. The new dosage form can influence the pharmacokinetic of the drug but this issue should be still studied. The studies of long-term stability of the carrier - WDL should also be continued.

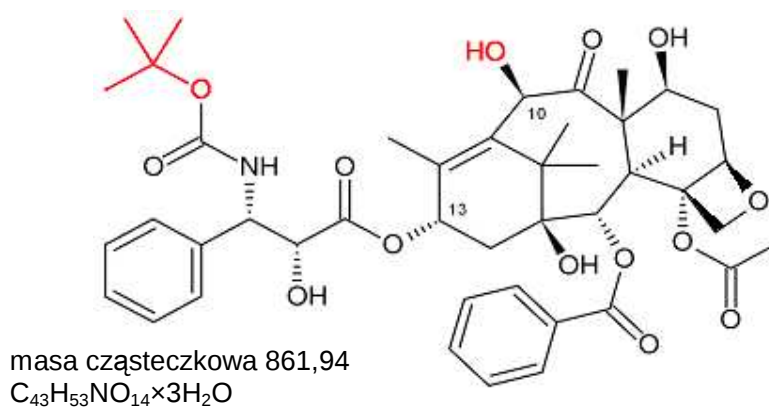
I. WSTĘP

1. PAKLITAKSEL - CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI

Paklitaksel jest pseudoalkaloidem diterpenowym, naturalnym związkiem posiadającym aktywność przeciwnowotworową. W trójpierścieniowym układzie paklitakselu występują dwa pierścienie sześciocłonowe i jeden ośmiocłonowy. Podstawnikami, oprócz grup hydroksylowych, są cztery ugrupowania estrowe, przy czym rozgałęziony podstawnik w położeniu 13 zawiera resztę benzoiloaminową i, jak stwierdzono, warunkuje w głównej mierze aktywność związku [1, 2]. Drugim taksanem, obok paklitakselu, który znalazł zastosowanie w lecznictwie jest docetaksel. Substancja ta różni się od paklitakselu brakiem ugrupowania acetylowego w pozycji 10 pierścienia i zmodyfikowanym łańcuchem w pozycji 13 [3-5]. Wzory strukturalne obu taksanów przedstawiają *Ryciny 1 i 2*.



Rycina 1. Wzór strukturalny paklitakselu.



Rycina 2. Wzór strukturalny docetakselu.

Paklitaksel pierwotnie otrzymywano z kory cisu amerykańskiego *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Przed wiekami Grecy uważali cis za drzewo śmierci, a Celtowie wykorzystywali je w celu przygotowywania trucizn do strzał. W Anglii z cisu wykonywano wieńce pogrzebowe i wierzono, że ten, kto stanie pod konarami tego drzewa może wkrótce umrzeć. Po latach okazało się, że ekstrakty z cisu, używane niegdyś przez morderców i samobójców w celu niszczenia życia ludzkiego, mogą dawać chorym nadzieję na przedłużenie życia, a nawet wyleczenie ze śmiertelnej choroby [6].

Paklitaksel odkryto w ramach programu poszukiwania nowych substancji pochodzenia roślinnego o działaniu przeciwnowotworowym zorganizowanego przez National Cancer Institute. Badania nad działaniem wyciągu z kory cisu rozpoczęto w roku 1963. Obecnie paklitaksel pozyskuje się na drodze półsyntezy z prekursora bakkatyny III, otrzymywanej z igieł kilku rodzajów cisów (w zależności od regionu świata, głównie z *Taxus baccata*, *Taxus brevifolia* i *Taxus chinensis*) [1]. Udało się także opracować kilka metod całkowitej syntezy paklitakselu [4].

Paklitaksel jest krystalicznym proszkiem, koloru białego bądź jasnoszarego, praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie, ale rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych. Jego właściwości fizykochemiczne przedstawia *Tabela 1*.

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne paklitakselu [7-9]

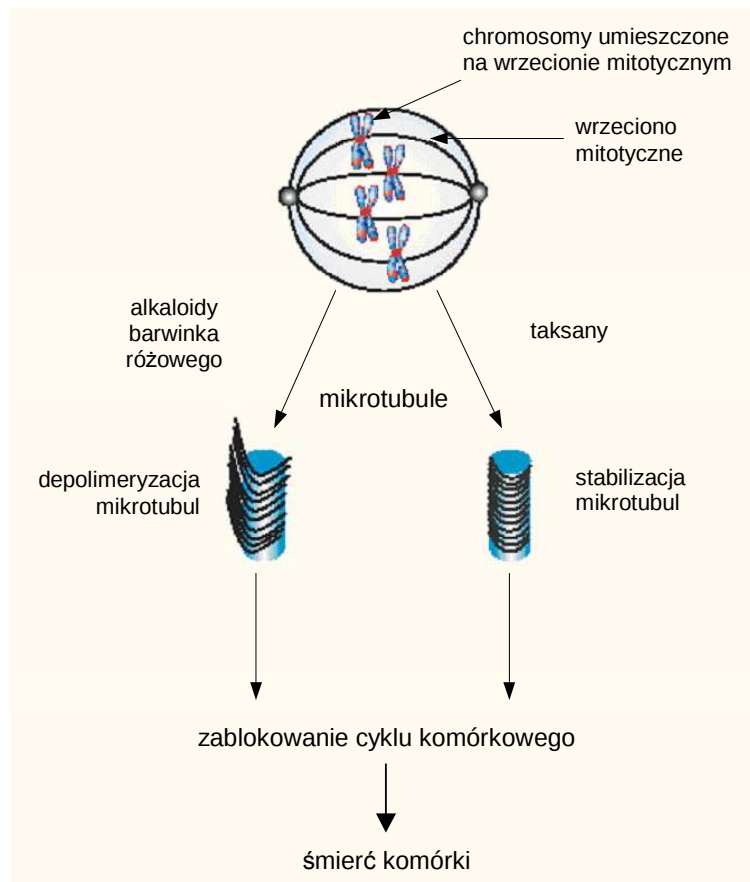
log P		7,83±0,83
temp. topnienia		216-217 °C
ROZPUSZCZALNOŚĆ		
woda		< 0,25 µg/ml
rozpuszczalniki organiczne	etanol	+ (ok. 39 mg/ml)
	izopropanol	+ (ok. 12 mg/ml)
	chlorek metylenu	+ (ok. 17 mg/ml)
	DMSO	+
	acetonitryl	+
	metanol	+
	tert-butanol	+

+ - rozpuszcza się

W wyniku prowadzonych prób syntezy paklitakselu z prekursorów znajdujących się w igłach cisu otrzymano wiele analogów, z których jeden, wspomniany już docetaksel, otrzymany na drodze półsyntezy z niecytotoksycznego prekursora deacylobakkatyny III, znalazł zastosowanie w leczeniu [10].

Docetaksel jest białym lub prawie białym proszkiem. Podobnie jak paklitaksel jest to substancja silnie lipofilna, nieco lepiej rozpuszczalna w wodzie, rozpuszczalna dobrze w alkoholach (metanolu i etanolu), chloroformie oraz DMSO [5, 10].

Taksany w unikalny sposób zaburzają funkcję mikrotubul. Paklitaksel już w niewielkim stężeniu wiąże się z mikrotubulami, z podjednostką β tubuliny - z N-końcem aminokwasu znajdującego się w pozycji 31. Powoduje to zmniejszenie stężenia tubuliny potrzebnej do utworzenia mikrotubul i zwiększa szybkość jej polimeryzacji. Mikrotubule syntetyzowane w obecności paklitakselu są krótsze, znacznie bardziej elastyczne (około 10-krotnie), stabilniejsze i nie ulegają depolimeryzacji. Takie mikrotubule są dysfunkcyjne - następuje zaburzenie ich prawidłowego układu, niezbędnego do przebiegu procesu mitozy. Zapobiega to tworzeniu się prawidłowego wrzeciona mitotycznego, prowadzi do uszkodzenia chromosomów i zahamowania replikacji komórek. Pod wpływem paklitakselu komórki zostają zablokowane w fazie G_2/M procesu mitozy i następuje ich śmierć. Niektóre związki działające przeciwnowotworowo także powodują zahamowanie powstawania wrzeciona mitotycznego, jednak mechanizm tego procesu jest inny niż w przypadku paklitakselu. Na przykład alkaloidy barwinka różowego (*Vinca rosea*, Apocynaceae) - winblastyna i winkrystyna - są odpowiedzialne za depolimeryzację mikrotubul (*Rycina 3*) [11-13].



Rycina 3. Mechanizm blokowania podziałów komórkowych przez taksany oraz alkaloidy barwinka różowego [14].

Aktualnie paklitaksel wskazany jest [15-17]:

- jako lek I lub II rzutu w leczeniu zaawansowanego nowotworu jajników:
 - jako lek I rzutu należy go stosować w skojarzeniu z cisplatyną w dawce 175 mg/m^2 w ciągu 3 h lub w dawce 135 mg/m^2 w ciągu 24 h,
 - jako lek II rzutu podawany jest w monoterapii w dawce 175 mg/m^2 w ciągu 3 h,
- w nowotworze piersi z zaatakowanymi węzłami chłonnymi w dawce 220 mg/m^2 przez 3 h jako lek wspomagający w terapii kombinowanej 24 h od podania doksorubicyny, bądź w skojarzeniu z trastuzumabem w dawce 175 mg/m^2 przez 3 h,
- w leczeniu nowotworu piersi z przerzutami przy nieskuteczności terapii kombinowanej, bądź, gdy nawrót choroby następuje w ciągu 6 miesięcy po chemioterapii,
- w terapii I rzutu niedrobnokomórkowego nowotworu płuc w skojarzeniu z cisplatyną u pacjentów niekwalifikujących się do operacji chirurgicznej i radioterapii,
- w mięsaku Kaposiego w terapii II rzutu u chorych na AIDS.

Udowodniono także skuteczność działania paklitakselu w nowotworach prostaty opornych na leczenie hormonalne, nowotworach układu moczowego, nowotworach w obrębie głowy i szyi, żołądka, nowotworach hematologicznych, drobnokomórkowym raku płuc czy raku szyjki macicy [7, 18].

W Klinice Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Szpitala Akademii Medycznej w Gdańsku wszystkie pacjentki, u których rozpoznaje się raka jajnika (w roku 2006 przyjęto na oddział ok. 200 pacjentek) otrzymują paklitaksel jako lek I rzutu.

Paklitaksel w dużym stopniu wiąże się z białkami osocza, ma dużą objętość dystrybucji oraz cechuje się słabą penetracją do centralnego układu nerwowego. Przypuszcza się, że paklitaksel może również indukować apoptozę i posiadać właściwości antynaczyniowe. Parametry farmakokinetyczne paklitakselu (Tabela 2) zależą nie tylko od dawki leku, ale także od cech osobniczych pacjenta [19].

Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne paklitakselu [16, 20, 21]

OKRES PÓŁTRWANIA ($t_{1/2}$) [h]		OBJĘTOŚĆ DYSTRYBUCJI (V_d) [L/m ²]	KLIRENS (CL) [L/h/m ²]	WIĄZANIE Z BIAŁKAMI OSOCZA
α	β			
0,27-0,32	3-50	11,6-24	200-700	89%-98%

Paklitaksel eliminowany jest z organizmu poprzez metabolizm wątrobowy (cytochrom P₄₅₀, odmiany CYP 2C8, 3A4). Jego zastosowanie jest niemożliwe u osób z dysfunkcjami wątroby [19].

W porównaniu z paklitakselem, docetaksel charakteryzuje się dłuższym okresem półtrwania oraz dłużej utrzymuje się w tkankach. Aktualnie dostępny jest tylko jeden preparat zawierający docetaksel - Taxotere (Sanofi-Aventis). Po podaniu Taxotere pacjentom z rakiem piersi obserwuje się ich dłuższe przeżycie ogólne, jednak pojawia się więcej niebezpiecznych działań niepożądanych, co łącznie z wysokim kosztem leczenia za pomocą docetakselu powoduje, że lekarze częściej decydują się na terapię paklitakselem [19]. Przybliżone ceny dawki preparatów taksanów podawanej w jednym cyklu przedstawiają się następująco [22]:

- Taxol - 1000 \$,
- preparaty generyczne paklitakselu - 150 \$,
- Abraxane - 4200 \$,
- Taxotere - 2500 \$.

2. PAKLITAKSEL - DROGA I SPOSÓB PODAWANIA, POSTACIE LEKU STOSOWANE W LECZNICTWIE, TOKSYCZNOŚĆ

Możliwość zastosowania jedynie wody jako nośnika uniemożliwia podanie w formie wlewu substancji trudno rozpuszczalnych. Aby uzyskać odpowiednie stężenie paklitakselu w celu jego podania dożylnego zastosowano solubilizację micelną. W preparatach handlowych jako solubilizator często używany jest Cremophor EL.

Taxol (Bristol-Myers Squibb), pierwszy wprowadzony na rynek preparat paklitakselu, jest bezbarwnym lub lekko żółtym, lepkim, bezwodnym koncentratem przeznaczonym do rozcieńczenia odpowiednim płynem infuzyjnym przed podaniem. W 1 ml jałowego, apirogenego koncentratu znajduje się:

- ✓ 6 mg paklitakselu,
- ✓ 527 mg (50,1%, obj./obj.) Cremophoru EL (polioksyetylenowany olej rącznikowy),
- ✓ 396 mg (49,7%, obj./obj.) bezwodnego alkoholu etylowego.

Taxol jest dostępny w wielodawkowych fiolkach zawierających 30 mg (5 ml), 100 mg (16,7 ml), 150 mg (25 ml) lub 300 mg (50 ml) paklitakselu [15].

Oprócz preparatu oryginalnego dostępne są także preparaty generyczne paklitakselu (Tabela 3). Wszystkie mają postać koncentratów do sporządzania roztworu do infuzji, w których stężenie substancji leczniczej wynosi 6 mg/ml [23-26].

Tabela 3. Preparaty paklitakselu dostępne w Polsce [23]

NAZWA HANDLOWA PREPARATU	PRODUCENT	DOSTĘPNE OBJĘTOŚCI
<i>Taxol</i>	Bristol-Myers Squibb	5 ml, 16,7 ml, 25 ml, 50 ml
<i>Paclitaxel</i>	Pliva Kraków AWD Pharma	5 ml, 16,7 ml
<i>Paclitaxel Mayne</i>	Mayne Pharma	5 ml, 25 ml, 50 ml
<i>Poltaxel</i>	Polfa Tarchomin/ Bristol-Myers Squibb	5 ml, 16,7 ml, 50 ml
<i>Paxene</i>	Norton Healthcare, IVAX Pharmaceuticals UK i Aston Lane North	5 ml, 20 ml, 30 ml, 50 ml
<i>Paclitaxin</i>	Pharmachemie	5 ml, 16,7 ml, 50 ml
<i>Sindaxel</i>	S. C. Sindan-Pharma	8 ml, 20 ml, 50 ml

Wszystkie preparaty generyczne zawierające paklitaksel mają taki sam skład jakościowy i ilościowy w odniesieniu do substancji pomocniczych. Dodatkowo w skład niektórych preparatów generycznych wchodzi bezwodny kwas cytrynowy (2 mg/ml), pełniący rolę stabilizatora układu.

W Polsce zarejestrowano także Paclitaxel WZF (Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne *Polfa*), liofilizat do sporządzania koncentratu do infuzji. W fiolce znajduje się 30 mg liofilizatu, a w ampule 10 ml rozpuszczalnika (mieszanina Cremophoru EL i etanolu bezwodnego). Mimo uzyskanej rejestracji, z powodu braku odpowiedniej linii produkcyjnej, nie uruchomiono jego produkcji.

Unikatowym preparatem, który został wprowadzony na rynek w 2005 roku, jest Abraxane, liofilizat, z którego bezpośrednio przed podaniem przygotowuje się nanozawiesinę. Dokładną charakterystykę preparatu przedstawiono w *Rozdziale 4*.

Aby uzyskać końcowe stężenie paklitakselu w zakresie od 0,3 mg/ml do 1,2 mg/ml, Taxol, tak jak i inne koncentraty, należy rozcieńczać (od 5 do 20 razy) jednym z następujących płynów infuzyjnych:

- 0,9% roztworem chlorku sodu,
- 5% roztworem glukozy,
- 5% roztworem glukozy z 0,9% roztworem chlorku sodu,
- 0,9% roztworem glukozy w roztworze Ringera.

Paklitaksel jest najczęściej podawany w dawkach 135 mg/m² lub 175 mg/m² w 24- lub 3-godzinnej infuzji, powtarzanej co 3 tygodnie, chociaż czasami stosuje się wyższe dawki i dłuższy okres wlewu. Maksymalna dawka tolerowana paklitakselu podawanego w 3-godzinny wlew wynosi 225-240 mg/m² (37,5-40 ml koncentratu), jednak takiej dawce towarzyszy znaczny spadek ciśnienia [15, 17, 27].

Objawy niepożądane po podaniu preparatu Taxol najczęściej dotyczą układu krążenia, układu pokarmowego, oddechowego, nerwowego, zmian skórnych i zmian w obrazie krwi [15, 17, 28, 29]. Działania niepożądane wynikają nie tylko z obecności paklitakselu, ale również (dotyczy to głównie nadwrażliwości) z obecności Cremophoru EL. Właściwości tego solubilizatora opisano w *Rozdziale 3*. W celu zredukowania reakcji nadwrażliwości wszyscy pacjenci przed podaniem paklitakselu powinni otrzymać premedykację. Premedykacja polega na podaniu kortykosteroidów, leków przeciwhistaminowych i antagonistów receptora H_2 . Pacjenci otrzymują np. 20 mg deksametazonu doustnie na 12 i 6 godzin przed rozpoczęciem leczenia, 50 mg difenhidraminy dożylnie oraz 300 mg cymetydyny lub 50 mg ranitydyny dożylnie na 30 do 60 minut przed podaniem paklitakselu [15, 17].

Przy stosowaniu odpowiedniej premedykacji reakcje nadwrażliwości są zwykle łagodne (zaczerwienienie twarzy, wysypka na skórze, skrócenie oddechu), jakkolwiek poważne reakcje (niedociśnienie wymagające leczenia, duszność wymagająca leków rozszerzających oskrzela, obrzęk naczynioruchowy lub uogólniona pokrzywka) mogą występować nawet, gdy została zastosowana premedykacja. Należy wówczas natychmiast zaprzestać podawania paklitakselu [15, 17].

Ze względu na możliwość wystąpienia poważnych reakcji nadwrażliwości po podaniu preparatu, leczenie paklitakselem powinno być prowadzone w warunkach zapewniających możliwość podjęcia intensywnej terapii wspomagającej. Paklitaksel powinien być podawany pod nadzorem lekarza wyspecjalizowanego w prowadzeniu chemioterapii przeciwnowotworowej.

Podczas rozcieńczania, podawania oraz wykonywania innych czynności związanych ze stosowaniem paklitakselu należy przestrzegać aktualnie obowiązujących zaleceń dotyczących pracy z lekami cytostatycznymi. Podobnie jak w przypadku innych leków przeciwnowotworowych, podczas przygotowywania i stosowania paklitakselu należy zachować szczególną ostrożność. Rozcieńczanie koncentratu i przygotowywanie roztworów do wlewu dożylnego powinno być wykonane przez personel odpowiednio wyszkolony, w warunkach aseptycznych i w przeznaczonych do tego pomieszczeniach. Tak jak wszystkie preparaty przeznaczone do podawania pozajelitowego, roztwory paklitakselu należy przed zastosowaniem obejrzeć - roztwory z widocznym osadem lub strąkami odrzuca się. Roztwory powinny być także obserwowane w trakcie przetaczania. W przypadku pojawienia się widocznych zmian w preparacie należy przerwać wlew [15, 17, 27].

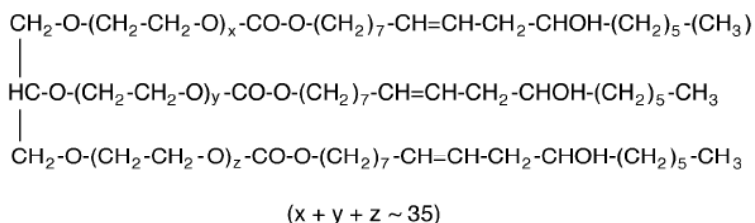
Po pierwszym pobraniu koncentratu z fiolki wielodawkowej, pozostały w fiołce preparat można przechowywać w warunkach oświetlenia i temperatury pokojowej nie dłużej niż 28 dni. Właściwe przygotowanie roztworu do infuzji pozwala na zachowanie chemicznej, mikrobiologicznej, a przede wszystkim fizycznej stabilności przez 27 h (wliczając również

czas przygotowania i podawania), w warunkach oświetlenia i temperatury pokojowej. Pojawiają się doniesienia o występowaniu precypitacji podczas ostatnich etapów podawania preparatu Taxol we wlewie 24-godzinny (również w przewodach do podawania leku). Aby uniknąć tego zjawiska zaleca się jak najszybsze podanie preparatu po rozcieńczeniu oraz unikanie nadmiernego wzbudzania, wstrząsania, czy potrząsania [15, 27]. Nie należy zamrażać roztworów otrzymanych z koncentratu [15].

Trwałość gotowego preparatu jest ograniczona ze względu na tendencję do precypitacji w wodnym nośniku, zwłaszcza przy stężeniu paklitakselu powyżej 0,6 mg/ml [7]. Z tego powodu roztwór preparatu Taxol powinien być podawany dożylnie przez zestaw zawierający filtr o średnicy porów nie większej niż 0,22 μm [15, 17]. Nie zaobserwowano istotnej utraty aktywności leku w trakcie przetwarzania roztworu preparatu Taxol przez zestaw do wlewu dożylnego z filtrem [27].

3. CREMOPHOR EL - CHARAKTERYSTYKA I TOKSYCZNOŚĆ SUBSTANCJI

Polioksyetylenowany olej rącznikowy - Cremophor EL (*Rycina 4*) - jest niejonowym związkiem amfifilnym i jednym z nielicznych związków powierzchniowo czynnych dopuszczonych do stosowania w lekach pozajelitowych.



Rycina 4. Wzór strukturalny Cremophoru EL.

Cremophor jest wykorzystywany do solubilizacji nie tylko paklitakselu, ale również tenipozytu, cyklosporyny A, czy takrolimusu. W przypadku paklitakselu dawka Cremophoru EL wynosi aż 12 ml/m², natomiast w innych lekach do 5,5 ml/m² [30]. Po podaniu dawki 175 mg/m² dające się oznaczyć stężenie Cremophoru EL w osoczu utrzymuje się przez 24 h od podania preparatu [31].

FDA (Food and Drug Administration) dopuszcza maksymalne stężenie Cremophoru EL w preparatach do wstrzykiwań do 65% [32]. LD₅₀ Cremophoru po podaniu dożylnym u psów wynosi 0,64 g/kg, a u myszy 2,5 g/kg [31].

Oprócz Cremophoru najczęściej stosowanymi substancjami zwiększającymi rozpuszczalność są: polisorbata 80, estry kwasów tłuszczowych i sorbitanu - Span, fosfolipidy, deoksycholan sodu oraz poloksamer. Wśród tych związków Cremophor jest najsilniejszym solubilizatorem, lecz odznacza się największą toksycznością i wywołuje liczne działania niepożądane. Do najczęstszych należą: reakcje nadwrażliwości - od

pokrzywek do pełnoobjawowego wstrząsu anafilaktycznego. Są one spowodowane wytwarzaniem przeciwciał IgE oraz uwalnianiem histaminy na drodze bezpośredniej. Cremophor EL może spowodować uwolnienie histaminy i spadek ciśnienia już w ciągu 10 minut po jego podaniu dożylnym [7, 28, 33].

Mimo swojej toksyczności Cremophor jest często jedyną alternatywą dla substancji wymagających podania dożylnego, ale słabo rozpuszczalnych w wodzie. Trudno znaleźć związek o mniejszej toksyczności i podobnych właściwościach solubilizujących, który jednocześnie zapewniłby uzyskanie preparatu o odpowiedniej trwałości. W celu zwiększenia rozpuszczalności docetakselu udało się wykorzystać inny, bezpieczniejszy solubilizator - polisorbata 80. Preparat handlowy stanowi koncentrat do przygotowania roztworu do wlewu dożylnego - roztwór docetakselu w polisorbacie 80 (40 mg/ml).

Olej rącznikowy składa się głównie z glicerydów kwasu rycynooleinowego, izorycynooleinowego, stearynowego i dihydroksystearynowego. Polioksyetylenowany olej rącznikowy stanowi grupę związków otrzymywanych w wyniku reakcji tlenku etylenu z olejem rącznikowym lub uwodornionym olejem rącznikowym. Najbardziej popularna nazwa handlowa tych związków to Cremophory. Cremophorami określa się nie tylko estry polioksyetylenoglicerolu z kwasami tłuszczowymi, ale i etery polioksyetylenoglikolu z alkoholami tłuszczowymi. Poszczególne typy Cremophorów różnią się ilością jednostek tlenku etylenu w cząsteczce [34].

Cremophor EL jest białawą, lepłą cieczą o masie cząsteczkowej ok. 3 kD. Wybrane właściwości fizyczne Cremophoru EL przedstawia *Tabela 4*. Otrzymuje się go w wyniku reakcji oleju rącznikowego z tlenkiem etylenu w stosunku 1:35 [34]. Głównym składnikiem jest oksyetylenowany 35 cząsteczkami tlenku etylenu rycynooleinian glicerolu. Pozostałe składniki hydrofobowe to estry kwasu tłuszczowego i glikolu polioksyetylenowego oraz niezmieniony olej rącznikowy. Część hydrofilowa składa się z glikoli polioksyetylenowych i etoksylovanego glicerolu [35].

Tabela 4. Właściwości fizyczne Cremophoru EL [35, 36]

GĘSTOŚĆ	pH	LEPKOŚĆ	KRYTYCZNE STĘŻENIE MICELARNE (CMC)	HLB	NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE ROZTWORU 0,1%	TEMPERATURA TOPNIENIA
1,05-1,06 g/cm ³	6-8	650-800 mPa·s	0,009%	12-14	40,9 mN/m	19-20 °C

Z powodu obecności solubilizatora, który ma zdolność do wypłukiwania z opakowań plastifikatora - hepatotoksycznych ftalanów, paklitaksel musi być podawany w opakowaniach pozbawionych PCV.

Cremophor znacznie zmienia farmakokinetkę paklitakselu. Farmakokinetyka leku umieszczonego w micelach, a przez to mniej dostępnego do dystrybucji tkankowej, metabolizmu i wydalania żółciowego, jest nieliniowa, podczas gdy farmakokinetyka paklitakselu w preparacie pozbawionym Cremophoru jest liniowa [37, 38]. Również docetaksel, do którego solubilizacji wykorzystano polisorbát 80, cechuje się liniową farmakokinetką [19].

Badania dowiodły, że sam Cremophor może potęgować działanie cytotoksyczne paklitakselu w wyniku zablokowania cyklu komórkowego (w inny sposób niż paklitaksel) oraz odwrócenia genotypowej odporności na lek. Nie ma jednak pewności, czy osiągnęte podczas wlewu roztworu z paklitaksem stężenie Cremophoru jest wystarczające, aby mógł on działać w ten sposób [38].

Cremophor EL zmienia gęstość lipoprotein o dużej gęstości (HDL) i może wywołać hiperlipidemię. Substancja powoduje zmianę kształtu erytrocytów oraz limfocytów 24 h po podaniu leku. 48 h od podania leku krwinki odzyskują swój fizjologiczny kształt [39]. Neuropatia obwodowa spowodowana zniszczeniem i demielinizacją aksonów jest również prawdopodobnie spowodowana przez Cremophor, ponieważ paklitaksel nie ma właściwości przenikania do obwodowego układu nerwowego. Neuropatię stwierdzono u 25% pacjentów otrzymujących roztwór cyklosporyny A, także zawierający Cremophor EL. Z kolei po podaniu roztworu docetakselu, zawierającego polisorbát zamiast Cremophoru, częstość występowania neuropatii zmniejszyła się 10-krotnie. Za neuropatię odpowiedzialne są prawdopodobnie obecne w Cremophorze resztkowe ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz powstające podczas produkcji Cremophoru inne etoksylowane pochodne oleju rącznikowego [33].

4. ALTERNATYWNE POSTACIE LEKU DLA PAKLITAKSELU

Od chwili odkrycia paklitakselu trwają poszukiwania najkorzystniejszej dla niego postaci leku. Ze względu na swoją skuteczność substancja ta jest coraz częściej i chętniej stosowanym lekiem przeciwnowotworowym. Niestety, jak opisano powyżej, działania niepożądane Cremophoru EL ograniczają często zastosowanie paklitakselu. Głównym celem prac jest wyeliminowanie z układu Cremophoru EL. Aktualnie badania nad nową postacią dla paklitakselu mają na celu [7, 40]:

- ❖ zwiększenie rozpuszczalności substancji w wyniku zastosowania współrozpuszczalników lub utworzenia emulsji,
- ❖ modyfikację struktury cząsteczki substancji - zastosowanie analogów i proleków,
- ❖ tworzenie kompleksów, np. z cyklodekstrynami,
- ❖ zastosowanie nanonośników - liposomów, miceli, nanocząstek,
- ❖ tworzenie koniugatów z białkami i polisacharydami,
- ❖ tworzenie form "depot" - implanty, żele i pasty do implantacji, mikrosfery.

W Tabeli 5 przedstawiono układy, które aktualnie są w trakcie badań klinicznych.

Tabela 5. Preparaty paklitakselu w fazie badań klinicznych [41-44]

NAZWA PREPARATU	ZASTOSOWANIE	FAZA BADAŃ	MAKSYMALNA DAWKĄ TOLEROWANA	CZAS PODANIA
PROLEKI				
Taxoprexin	czerniak z przerzutami	II	1100 mg/m ² co 3 tyg.	i. v. 2 h
	NSCLC	III		
Xyotax	nabłonkowy rak jajnika rak w obrębie jamy otrzewnowej	III	233 mg/m ² co 3 tyg.	i. v. 10 min
	rak piersi u mężczyzn nawracający rak piersi stadium IV raka piersi	II		
ANALOGI				
BMS 184476	nowotwory u osób dorosłych	I	60 mg/m ² co 3 tyg.	i. v. 1 h
DJ 927			27 mg/m ² co 3 tyg.	doustnie
BMS 275183	zaawansowany lub przerzutowy NSCLC	II i III	200 mg/m ² co 7 dni	doustnie
Ortataxel	nowotwory leczone lekiem oryginalnym	II	75 mg/m ² co 3 tyg.	doustnie 5 dni lub i. v. 1 h
RPR 109881A	rak piersi zaawansowany rak piersi MBC	II	60 mg/m ² co 3 tyg.	i. v. 1 h
	stadium IV raka piersi MBC rak piersi u mężczyzn	III		
UKŁAD MICELARNY				
Genexol PM	rak trzustki (stadium III, IVA, IVB) nawracający rak trzustki	II	300 mg/m ² co 3 tyg.	i. v. 3 h
ŻEL				
OncoGel	rak trzustki, przełyku, piersi, NSCLC	II	objętość odpowiadająca 30% objętości guza, stężenie leku 6 mg/g	podanie w okolicę guza
LIPOSOMY				
Liposome encapsulated paclitaxel (LEP)	stadium III i IV raka przełyku gruczolak przełyku nawracający rak przełyku	II	175 mg/m ² co 3 tyg.	i. v. przez 45-60 min
	porównanie tolerancji preparatu z lekiem oryginalnym	I		
EMULSJA				
Tocosol	rak piersi	III	brak informacji	i. v. 15 min
MIKROSFERY				
Paclimer	nawracający nabłonkowy rak jajnika oraz nowotwory w obrębie jamy otrzewnowej	I	brak informacji	podanie w okolicę guza lub dootrzewnowe

NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) - niedrobnokomórkowy rak płuc

MBC (Metastatic Breast Cancer) - rak piersi z przerzutami

Zaletami preparatów znajdujących się w trakcie badań klinicznych są, w zależności od postaci leku, m. in. krótszy czas wlewu, mniejsze prawdopodobieństwo pojawienia się objawów nadwrażliwości, mielosupresji czy łysienia. Nowe preparaty mogą zapewnić pacjentom większy komfort leczenia oraz umożliwić leczenie za pomocą paklitakselu nowych rodzajów nowotworów. Aktualnie nie ma jednak dowodów na to, że gwarantują większą przeżywalność chorych niż stosowany lek oryginalny Taxol [41]. Nie zawsze udaje się całkowicie wyeliminować toksyczny solubilizator, ale w nowoprojektowanych preparatach dąży się do zmniejszenia jego stężenia.

Próby uzyskania trwałego preparatu paklitakselu w postaci koniugatu z białkami zakończyły się sukcesem i zaowocowały wprowadzeniem w 2005 roku przez FDA (Food and Drug Administration) na rynek w Stanach Zjednoczonych pierwszego innowacyjnego preparatu paklitakselu w postaci nanosuspensji - Abraxane (Abraxis BioScience). Preparat ten nie zawiera Cremophoru EL w swoim składzie. Układ jest przygotowywany przez ciśnieniową homogenizację paklitakselu w obecności albuminy ludzkiej w stężeniu 3-4%, czyli podobnym do stężenia albuminy we krwi. W ten sposób otrzymuje się koloidalną nanosuspensję. Wielkość nanocząstek mieści się w granicach 130-150 nm, co wynosi ok. 1/100 średnicy erytrocytu. Układ ten nie zawiera żadnych współrozpuszczalników ani solubilizatorów. Ponadto zaobserwowano, że cząstki nanosuspensji wykazują tendencję do gromadzenia się w okolicy guza i lek przechodzi do zmienionych nowotworowo tkanek. Abraxane jest pierwszym chemioterapeutykem, który wykorzystuje receptor gp60 (albondin) - pośrednią drogę w ścianie komórek endotelialnych mikropęcherzyków guza - by osiągnąć zwiększone stężenie leku w obrębie nowotworu. Receptory gp60 są specyficzne dla albuminy i raz aktywowane pozwalają na transport kompleksów z albuminami przez barierę ścian naczyń krwionośnych do tkanek nowotworowych.

Abraxane produkowany jest w postaci liofilizatu zawierającego w fiolce 100 mg paklitakselu, który zawieszają w 20 ml 0,9% roztworu chlorku sodu bezpośrednio przed podaniem pacjentowi. Rozpuszczalnik do fiolki dodaje się powoli, po ściankach, aby uniknąć pienienia. Po jego dodaniu pozostawia się zawartość fiolki na 5 min w celu dokładnego zwilżenia liofilizatu, a następnie delikatnie miesza przez ok. 2 min. Preparat jest trwały 8 h od przygotowania. Pacjent otrzymuje paklitaksel w postaci preparatu Abraxane w dawce 260 mg/m^2 . Obliczoną objętość zawiesiny (ok. 90 ml) pobiera się i dostrzykuje do pustego, jałowego worka wykonanego z PCV i podaje pacjentowi w 30-minutowym wlewie dożylnym. Zawiesina powinna być mleczna i homogenna. Brak w składzie Cremophoru EL eliminuje konieczność zastosowania premedykacji oraz niebezpieczeństwo wypłukiwania ftalanów z opakowań lub zestawów do przetaczania. Już badania przedkliniczne dowiodły, że paklitaksel podany w postaci preparatu Abraxane charakteryzuje się lepszą biodystrybucją i dłuższym czasem biologicznego półtrwania,

a jego stężenie w tkankach guza jest większe o ok. 33% w porównaniu ze standardowym preparatem paklitakselu. W chwili obecnej Abraxane w porównaniu z lekiem oryginalnym jest wskazany tylko w leczeniu nowotworu piersi z przerzutami przy nieskuteczności terapii kombinowanej, bądź, gdy nawrót choroby następuje w ciągu 6 miesięcy po chemioterapii [31, 45-47].

W II i III fazie badań klinicznych znajdują się dwa preparaty zawierające paklitaksel w formie proleku. Są to Taxoprexin i Xyotax. Taxoprexin, to układ, w którym paklitaksel jest kowalencyjnie związany z naturalnym kwasem tłuszczowym - kwasem dekozaheksaenowym (DHA). Zaprojektowano go tak, aby spełniał funkcję proleku i kumulował się przede wszystkim w tkance guza. Maksymalne stężenie paklitakselu w preparacie gotowym do podania pacjentowi może wynosić 8 mg/ml (dla porównania Taxol i leki generyczne - 1,2 mg/ml, a Abraxane - 5 mg/ml) i podaje się go przez 2 h (dożylnie, co 21 dni). W układzie występuje Cremophor EL i etanol bezwodny (w stosunku takim samym jak w preparacie Taxol, 1:1, obj./obj.), jednak w ilości 5 razy mniejszej niż w leku standardowym. Stężenie paklitakselu w tkance guza po podaniu proleku jest 21 razy wyższe niż we krwi. Preparat jest mniej toksyczny niż lek standardowy, a działania niepożądane występują w mniejszym stopniu. Układ cechuje się lepszą aktywnością przeciwnowotworową. Czas biologicznego półtrwania leku w tkance guza wynosi 240 h, podczas gdy okres biologicznego półtrwania paklitakselu podawanego w formie preparatu Taxol jest 15 razy krótszy - średnio 16 h [48, 49].

Duże nadzieje wiąże się również z preparatem Xyotax (paclitaxel polyglumex), w którym paklitaksel tworzy koniugat z biodegradowalnym, rozpuszczalnym w wodzie polimerem kwasu glutaminowego (aminokwasu występującego w organizmie). Utworzona makrocząsteczka ma masę ok. 80 000 Da i zawiera 37% paklitakselu (wag./wag.). Koniugat ten umożliwia uzyskanie większej rozpuszczalności paklitakselu. Lek w takiej formie lepiej penetruje do tkanek guza, przez dłuższy okres przebywa w zmienionym chorobowo miejscu, w mniejszym stopniu działa na inne tkanki i w pierwszej kolejności jest wychwytywany przez komórki guza, a nie przez pompę wielolekową. Dzięki zdolności kwasu poliglutaminowego do zwiększenia rozpuszczalności silnie hydrofobowych cząsteczek, preparat Xyotax nie zawiera Cremophoru EL. Pozwala to na skrócenie czasu infuzji (10 min) i eliminuje konieczność stosowania premedykacji [50, 51].

Utworzenie odpowiednich analogów paklitakselu stwarza możliwość uzyskania związków lepiej rozpuszczalnych w wodzie, wykazujących mniej działań niepożądanych i większą skuteczność działania przeciwnowotworowego. Analog BMS-184476 otrzymano przez zastąpienie grupy hydroksylowej w pozycji 7 ugrupowaniem eterowym - metylotiometylowym. Spowodowało to zwiększenie rozpuszczalności paklitakselu i pozwoliło na 5-krotne zredukowanie zawartości Cremophoru EL w układzie w porównaniu z ilością solubilizatora obecnego w Taxolu. Analog ten zarówno

w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* wykazuje większą siłę działania niż lek oryginalny i jest skuteczny w przypadkach nowotworów opornych na paklitaksel [52, 53]. Z kolei analog RPR 109881A jest półsyntetycznym taksanem o zbliżonym do docetakselu mechanizmie działania. Charakteryzuje się szerokim spektrum działania zarówno w nowotworach wrażliwych jak i opornych na docetaksel. Analog ten posiada zdolność przenikania przez barierę krew-mózg. Stanowi to szansę na zastosowanie tej substancji m. in. w nowotworach mózgu. W układzie zawierającym RPR 109881A jako rozpuszczalnika użyto roztworu polisorbitatu 80. Preparat ten wymaga stosowania premedykacji [54].

Znajdujące się w fazie badań klinicznych analogi DJ-927, BMS-275183 [55] oraz Ortataxel [56] mogą być podawane drogą doustną. Ortataxel jest skuteczny w nowotworach opornych na działanie paklitakselu. Związek ten charakteryzuje się mniejszą toksycznością w porównaniu z paklitakselem i większym spektrum działania. Preparat można podawać zarówno doustnie jak i dożylnie. Po podaniu dożylnym Ortataxel wykazuje podobną siłę działania do paklitakselu. DJ-927 jest skuteczny w przypadkach nowotworów opornych na paklitaksel. Zaobserwowano większą skuteczność działania zarówno w porównaniu z paklitakselem jak i docetakselem. Profil farmakokinetyczny związku jest zbliżony do dostępnych aktualnie na rynku taksanów, ale wchłanianie następuje również po podaniu doustnym. Lek wykazuje długi czas półtrwania. Możliwość podania doustnego eliminuje konieczność zastosowania toksycznych nośników i niebezpieczeństwo reakcji nadwrażliwości [41].

Preparatem paklitakselu o przedłużonym działaniu jest OncoGel zawierający 6 mg/g paklitakselu. Lek podawany jest lokalnie, w postaci wstrzyknięcia bezpośrednio do guza. Objętość wstrzykniętego preparatu stanowi 30% objętości guza. Lek można aplikować zarówno w szpitalu jak i w domu pacjenta. OncoGel pozwala uniknąć działań niepożądanych i toksycznych, jakie wiążą się z dożylnym podaniem leku. Pojedyncza aplikacja OncoGelu zapewnia wysokie stężenie leku w nowotworze przez dłuższy okres czasu, z minimalną dystrybucją leku do innych narządów. Żel uwalnia substancję czynną w sposób ciągły przez 6 tygodni, w wyniku dyfuzji substancji w polimerze kwasu mlekowego i glikolowego oraz glikolu polietylenowego. Zastosowane polimery ulegają biodegradacji, co eliminuje konieczność chirurgicznego usuwania nośnika. OncoGel przeznaczony jest do leczenia nowotworów nieoperowalnych oraz u źle rokujących pacjentów, nietolerujących dalszej, dożylnej terapii przeciwnowotworowej. OncoGel produkowany jest w strzykawkach o pojemności 2,5 ml, zawierających 1,2 ml preparatu [42, 43].

W celu uzyskania działania zlokalizowanego w obrębie nowotworu zaprojektowano mikrosfery z paklitakselem (Paclimer). Mikrosfery zbudowane są z biodegradowalnego polimeru fosfoestrowego (p(DAGP-EOP)) i zawierają 10% paklitakselu. Badania *in vitro* wykazały, że paklitaksel jest powoli uwalniany z mikrosfer (ponad 80% dawki po

80 dniach), natomiast badania *in vivo* dowodzą większej skuteczności przeciwnowotworowej Paclimeru w porównaniu do roztworu z Cremophorem i etanolem [57, 58]. Głównym składnikiem mikrosfer jest polimer kwasu mlekowego już stosowany w leczeniu jako element mikrosfer podawanych drogą pozajelitową (np. Lupron Depot (TAP Pharmaceutical Products)).

W preparacie Genexol-PM jako nośnik dla paklitakselu zastosowano micelle z biodegradowalnego polimeru metoksypolietylenoglikolu z polimerem kwasu D,L-mlekowego (mPEG-PDLLA). Dzięki tej postaci trzykrotnie wzrosła maksymalna tolerowana dawka paklitakselu (dawka śmiertelna LD₅₀ wzrosła ponad 25-krotnie) i zwiększyła się biodystrybucja leku do różnych tkanek, m. in. do wątroby, śledziony, nerek i płuc [38, 44]. W badaniach *in vivo* zaobserwowano większą aktywność przeciwnowotworową w porównaniu z lekiem standardowym. Ponieważ jest to układ pozbawiony Cremophoru EL, możliwe jest podanie pacjentom wyższych dawek leku bez zwiększania toksyczności.

Aby zmniejszyć toksyczność preparatu z paklitakselem spróbowano, wzorując się na układzie z doksorubicyną, zaprojektować liposomy jako nośnik dla paklitakselu (LEP - liposomal-encapsulated paclitaxel). W badaniach przedklinicznych układ prezentował zdolność do zmiany działania wielolekowej pompy u ludzi oraz podobną aktywność przeciwnowotworową w badaniach na myszach. Przed podaniem leku stosuje się rutynową premedykację, jednak stwierdzenie jej celowości oraz ocena możliwości pojawienia się działań niepożądanych wymagają dalszych badań [41].

W 2007 r. planuje się wprowadzenie do leczenia preparatu TOCOSOL - emulsji submikronowej, której głównym składnikiem jest witamina E. Preparat zawiera m. in. związek będący inhibitorem P-glikoproteiny [41, 59]. Wysoka rozpuszczalność leku w tym nośniku (1000 mg/100ml) pozwoli na skrócenie czasu wlewu do 15 min, a brak toksycznego Cremophoru ograniczy działania niepożądane i pozwoli na podanie znacznie wyższych dawek leku pacjentom. W badaniach klinicznych stwierdzono możliwość podawania co 1 lub 3 tyg. dawki trzykrotnie wyższej w porównaniu z preparatem Taxol [113]

5. SOLUBILIZACJA SUBSTANCJI LECZNICZEJ W CELU PODANIA DOŻYLNego - WYMAGANIA I METODY

Wiele substancji leczniczych wymaga zastosowania substancji pomocniczych, rozpuszczalników lub solubilizatorów, w celu zwiększenia rozpuszczalności aktywnego składnika i uzyskania odpowiedniej trwałości fizycznej roztworu. Forma roztworu wodnego jest warunkiem podania leku we wlewie dożylnym. Podstawowe sposoby zwiększania rozpuszczalności obejmują [60, 61]:

- utworzenie soli,

- uzyskanie odpowiedniego pH, w którym dana substancja ulega rozpuszczeniu,
- użycie współrozpuszczalników,
- użycie substancji powierzchniowo czynnych,
- użycie związków kompleksujących.

Bardzo często łączy się ze sobą kilka z wymienionych metod. Istnieje też możliwość uzyskania emulsji submikronowej lub liposomów, chociaż liposomy są głównie stosowane w celu uzyskania odpowiedniej farmakokinetyki leku, a nie zwiększenia rozpuszczalności [61, 62].

Nieodpowiedni dobór substancji pomocniczych (przede wszystkim surfaktantów) może powodować groźne dla pacjenta reakcje uboczne - hemolizę krwinek, wytrącenie leku w momencie kontaktu z krwią, zapalenie żył, ból w miejscu podania, a nawet zagrożenie życia w wyniku wstrząsu czy silnego toksycznego działania substancji pomocniczych [63-65]. Im wyższe stężenia współrozpuszczalników i związków powierzchniowo czynnych, tym większe niebezpieczeństwo pojawienia się działań ubocznych.

Idealny preparat do podania dożylnego powinien stanowić roztwór wodny i izotoniczny względem płynów ustrojowych, o pH ok. 7. Jeżeli substancja nie ulega rozpuszczeniu w neutralnym pH, w pierwszej kolejności podejmuje się próbę zwiększenia rozpuszczalności poprzez zmianę pH roztworu i/lub dodanie współrozpuszczalników - mieszających się z wodą, organicznych cieczy. Istotną rolę pełni tutaj znajomość stałej dysocjacji substancji ($pK_{a/b}$). W niektórych przypadkach, gdy mamy do czynienia z substancją słabo dysocjującą, rozwiązaniem jest utworzenie dobrze rozpuszczalnej soli. Uzyskanie roztworu soli słabego kwasu lub zasady jest możliwe tylko w środowisku o odpowiednim pH. Zmiana pH, np. w czasie rozcieńczania, może spowodować cofnięcie dysocjacji i wytrącenie z roztworu słabego kwasu lub zasady [68]. Wartość pH układów podawanych w formie szybkiego wstrzyknięcia (tzw. bolusa) powinna mieścić się w granicach od 2 do 12, natomiast pH wlewów dożylnych może wynosić od 2 do 10, lecz nie mogą to być układy buforowane [67].

Połączenie dwóch metod - modyfikacji pH układu i zastosowanie współrozpuszczalników - jest bardzo skutecznym sposobem zwiększenia rozpuszczalności substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie. *Tabela 6* przedstawia najczęściej stosowane współrozpuszczalniki w preparatach pozajelitowych stosowanych w lecznictwie. Są to etanol, glicerol, makrogol i glikol propylenowy. W preparatach do wstrzykiwań etanol może stanowić maksymalnie ok. 20% układu, a inne rozpuszczalniki organiczne - maksymalnie ok. 50%. W przypadku wlewów dożylnych stężenie w/w rozpuszczalników organicznych nie powinno przekraczać ok. 10%, chociaż istnieją wyjątki, np. stężenie glicerolu w roztworach infuzyjnych może wynosić maksymalnie ok. 15%, a dimetyloacetamidu maksymalnie ok. 3% [67].

Tabela 6 przedstawia również najczęściej stosowane surfaktanty. Surfaktanty są używane do zwiększania rozpuszczalności związków najtrudniej rozpuszczalnych w wodzie. Zwiększenie rozpuszczalności uzyskuje się przy stężeniu surfaktantu powyżej krytycznego stężenia micelnego (CMC), warunkującego tworzenie miceli.

Tabela 6. Surfaktanty i rozpuszczalniki organiczne występujące najczęściej w preparatach pozajelitowych [24, 27, 61]

SUBSTANCJA	ZAWARTOŚĆ W PRODUKCIE HANDLOWYM [%]	ZAWARTOŚĆ W PREPARACIE PODAWANYM PACJENTOM [%]	DROGA PODANIA	SUBSTANCJA LECZNICZA
Cremophor EL	51	≤10	wlew dożylny	paklitaksel
Cremophor RH 60	20	≤0,08	wlew dożylny	takrolimus
dimetyloacetamid	6	≤3	wlew dożylny	tenipozyd
etanol	5-80	≤6	podskórnice	dihydroergotamina
		≤10	domięśniowo	fenytoina
		≤10	wlew dożylny	paklitaksel
glicerol	15-32	≤15	dożylnie, domięśniowo, podskórnice	dihydroergotamina
		≤2,5	wlew dożylny	idarubicyna
N-metylo-2-pirolidon (Pharmasolv)	100	100	podskórnice	leuprolid
PEG 300	≤60	≤50	domięśniowo, bolus	metokarbamil
PEG 400	18-67	≤18	domięśniowo bolus	lorazepam
		≤9		lorazepam
polisorbat 80	0,075-100	4	domięśniowo	chlordiazepoksyd
		12	domięśniowo	witamina A
		≤0,4	bolus	amiodaron
		≤2	wlew dożylny	docetaksel
glikol propylenowy	10-80	≤80	domięśniowo	lorazepam
		≤68	bolus	fenobarbital
		≤6	wlew dożylny	medroksyprogesteron
Solutol HS 15	50	50	dożylnie	propanidid
	7	7	dożylnie	witamina K ₁

Bardzo często stosuje się mieszaniny rozpuszczalników i surfaktantów, w celu uzyskania odpowiedniej trwałości preparatu oraz stężenia rozpuszczonej substancji leczniczej. Przykłady preparatów zawierających trudno rozpuszczalne w wodzie substancje lecznicze przedstawiają Tabele 7 i 8 [24, 27, 61, 68].

Tabela 7. Wybrane solubilizowane produkty lecznicze zawierające wodę [24, 27, 61, 68]

SUBSTANCJA LECZNICZA PRODUKT/PRODUCENT	SKŁAD	SPOSÓB PODANIA	METODA ZWIĘKSZENIA ROZPUSZCZALNOŚCI
chlorowodorek amiodaronu Cordarone (Wyeth-Ayrest)	50 mg/ml polisorbat 80 10% alkohol benzylowy 2% pH 4,1	dożylnie	słaba zasada (pH<pKa), współrozpuszczalnik, micele
amfoterycyna B AmBisome (Gilead)	liofilizat 50 mg HSPC* 18 mg/ml DSPG** 7 mg/ml cholesterol 4 mg/ml α-tokoferol 0,05 mg/ml sacharoza 75 mg/ml bursztynian sodu 2 mg/ml pH 5-6	dożylnie	liposomy
diazepam Valium (Roche)	5 mg/ml glikol propylenowy 40% alkohol etylowy 10% alkohol benzylowy 1,5% kwas benzoesowy pH 6-7	domięśniowo, dożylnie - dostrzykiwany przez rozgałęzienie boczne w trakcie wlewu	współrozpuszczalnik
digoksyna Lanoxin (GlaxoSmithKline)	0,25 mg/ml glikol propylenowy 40% alkohol etylowy 10% fosforan sodu 0,17% kwas cytrynowy 0,08% pH 6,8-7,2	dożylnie 3-5 min domięśniowo	współrozpuszczalnik
fenobarbital sodowy Nembutal (Abbott)	50 mg/ml glikol propylenowy 40% alkohol etylowy 10% pH 9,5	domięśniowo, dożylnie	słaby kwas (pH>pKa) współrozpuszczalnik
sól sodowa fenytoiny Dilantin (Elkins-Sinn)	50 mg/ml glikol propylenowy 40% alkohol etylowy pH 10-12,3	domięśniowo, bolus	słaby kwas (pH>pKa) współrozpuszczalnik
itrakonazol Sporanox (Ortho Biotech and Janssen)	10 mg/ml hydroksypropylo-β-cyklodekstryna 40% glikol propylenowy 2,5% pH 4,5	dożylnie	kompleks z cyklodekstrynami
kalcytriol Calcijex (Abbott)	1-2 µg/ml polisorbat 20 4 mg/ml askorbinian sodu 10 mg/ml chlorek sodu 1,5 mg/ml wersenian disodowy 1,1 mg/ml fosforan sodu 9,2 mg/ml pH 6,5-8	bolus	micele
propofol Plofed (Polfa Warszawa) Diprivan (Astra Zeneca)	10 mg/ml olej sojowy 100 mg/ml glicerol 22,5 mg/ml lecytyna jajowa 12 mg/ml (wersenian disodowy)	dożylnie, bolus	emulsja
worykonazol Vfend (Pfizer)	liofilizat 200 mg sulfobutyloeter-β-cyklodekstryna 350 mg	domięśniowo	kompleks z cyklodekstrynami

* HSPC - uwodorniona fosfatydylocholina sojowa

** DSPG - distearoilofosfatydyloglicerol

Tabela 8. Bezwodne koncentraty do rozcieńczania w płynie infuzyjnym [24, 27, 61, 68]

SUBSTANCJA LECZNICZA PRODUKT/PRODUCENT	SKŁAD	SPOSÓB PODANIA
cyklosporyna Sandimmun (Novartis)	50 mg/ml Cremophor EL 65% alkohol etylowy 35%	dożylnie 2-6 h
docetaksel Taxotere (Sanofi Aventis)	40 mg/ml polisorbat 80	dożylnie 1 h
etopozyd VePesid (Bristol-Myers Squibb)	20 mg/ml PEG 300 60% alkohol etylowy 30% polisorbat 80 8% alkohol benzylowy 3% kwas cytrynowy 2 mg/ml pH 3-4	dożylnie 30-60 min
paklitaksel Taxol (Bristol-Myers Squibb)	6 mg/ml Cremophor EL 51% alkohol etylowy 49%	dożylnie 3 h lub 24 h
takrolimus Prograf (Astellas Pharma)	6 mg/ml Cremophor RH 60 20% alkohol etylowy 80%	dożylnie
tenipozyd Vumon (Bristol-Myers Squibb)	50 mg/ml Cremophor EL 50% alkohol etylowy 42% dimetyloacetamid 6% alkohol benzylowy 30 mg/ml pH 5 (kwas maleinowy)	dożylnie 30-60 min

Alternatywą dla związków słabo rozpuszczalnych w wodzie jest podjęcie próby zastosowania związków kompleksujących. W tym celu stosuje się α -cyklodekstryny oraz cyklodekstryny modyfikowane - hydroksypropylo- β -cyklodekstrynę i sulfobutyloeter- β -cyklodekstrynę, które charakteryzują się większymi zdolnościami solubilizacyjnymi [66, 67]. Przykładowe produkty handlowe zawierające modyfikowane cyklodekstryny przedstawiono w Tabeli 7.

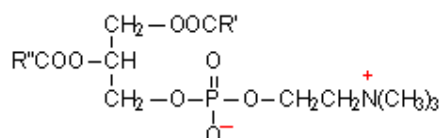
6. LECYTyna JAKO SUBSTANCJA POMOCNICZA W LEKACH POZAJELITOWYCH ORAZ WODNE DYSPEKSJE LECYTyny (WDL)

Wśród substancji pomocniczych stosowanych w technologii postaci leku tylko nieliczne uważa się za bezpieczne po podaniu drogą dożylną. Jedną z najważniejszych jest lecytyna - substancja pochodzenia naturalnego, otrzymywana z soi lub żółtka jaj kurzych na drodze ekstrakcji. Lecytyna stanowi złożoną mieszaninę fosfolipidów [35, 36].

Fosfolipidy to związki, które powstają w wyniku estryfikacji glicerolu pochodnymi kwasu fosforowego przy trzecim atomie węgla, podczas gdy pierwszy i drugi atom węgla połączony jest wiązaniem estrowym z łańcuchem acylowym kwasów tłuszczowych. Kwas

fosforowy może być związany z choliną, etanoloaminą, seryną, inozytolem, fosforanem inozytolu, glicerolem lub estrami glicerolu. W zależności od rodzaju związku połączanego z kwasem fosforowym oraz kwasów tłuszczowych powstają różne rodzaje fosfolipidów [35, 69].

USP 30/NF 25 opisuje lecytynę jajową jako mieszaninę nierozpuszczalnych w acetonie fosfolipidów, składającą się głównie z fosfatydylocholiny (*Rycina 5*), fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloseryny i fosfatydyloinozytolu oraz innych substancji (triglicerydów, kwasów tłuszczowych i węglowodanów). Frakcja nierozpuszczalna w acetonie stanowi nie mniej niż 50% substancji [70].



Rycina 5. Wzór strukturalny fosfatydylocholiny (R', R'' - reszty kwasów tłuszczowych).

Przy pierwszym węglu glicerolu występują przede wszystkim nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe (palmitynowy, stearynowy, oleinowy), natomiast przy drugim atomie węgla glicerolu - zazwyczaj reszty kwasów wielonienasyconych (linolowego, linolenowego). Fosfolipidy lecytyny z żółtek jaj zawierają mniejszą (17%) w porównaniu z lecytyną sojową (62%) ilość reszt acylowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co powoduje, że są bardziej odporne na procesy utleniania. Są również bogatsze w reszty nasyconych kwasów tłuszczowych: palmitynowego (33%) i stearynowego (14%) oraz jednonienasyconego kwasu oleinowego (27%). W lecytynie sojowej zawartość tych kwasów tłuszczowych wynosi odpowiednio: 15%, 3% oraz 12% [69, 71, 72]. Udział poszczególnych typów fosfolipidów w lecytynie jajowej i sojowej przedstawia *Tabela 9* oraz *Załączniki 1 i 2*.

Tabela 9. Przykładowa zawartość [%] fosfolipidów w lecytynie [69, 71, 72]

LECYTYNA	SOJOWA	JAJOWA
fosfatydylocholina	33	66-76
fosfatydyloetanolamina	14	15-24
fosfatydyloinozytol	16	-
fosfatydyloseryna	0,4	1
kwasy fosfatydowe	6	-
sfigomielina	-	3-6
lizofosfatydylocholina	0,9	3-6
lizofosfatydyloetanolamina	0,2	3,6

Fosfolipidy są głównym elementem strukturalnym błon komórkowych, a także błon cytoplazmatycznych wielu organelli komórkowych, np. mitochondriów. Występują we wszystkich komórkach ustroju i odgrywają ważną rolę w podstawowych procesach życiowych komórki, determinując przepuszczalność i płynność błon. Przez wiązanie rybosomów ze strukturami membranowymi wywierają także wpływ na replikację DNA i biorą udział w syntezie białek. Fosfolipidy skupiając się na powierzchni kompleksów lipoproteinowych stabilizują je w środowisku wodnym, jakim jest osocze. Ponad połowę fosfolipidów osocza stanowi fosfatydylocholina. Stężenie fosfolipidów w osoczu zmienia się na ogół w zależności od zmian stężenia cholesterolu całkowitego, lecz proporcja fosfolipidów do cholesterolu całkowitego zwykle wynosi ok. 1,1 (wag./wag.). Fosfolipidy są również surfaktantem pęcherzyków płucnych oraz odgrywają ważną rolę w trawieniu i wchłanianiu tłuszczów pokarmowych (głównie fosfatydylocholina). Fosfatydylocholina, jako składnik żółci, pośredniczy w tworzeniu miceli tłuszczowych w świetle jelita. Ponieważ fosfolipidy stanowią integralną część błon i uczestniczą w trawieniu, procesy ich syntezy oraz metabolizmu są naturalnymi zjawiskami zachodzącymi w organizmie [73].

Pochodzenie i stopień oczyszczenia lecytyny ma decydujący wpływ na właściwości fizyczne oraz skład substancji [36, 74]. Lecytyna może mieć postać od lepkiej, półpłynnej masy do proszku, co może być związane z zawartością wolnych kwasów tłuszczowych. Zabarwienie lecytyny zmienia się od brązowego do jasnożółtego, w zależności od pochodzenia substancji oraz stopnia jej utlenienia. W wyniku kontaktu z powietrzem następuje szybki proces utleniania, który powoduje, że barwa substancji staje się ciemniejsza. Lecytyna praktycznie nie ma zapachu, jest substancją higroskopijną, ulega rozkładowi w skrajnych warunkach pH oraz pod wpływem mikroorganizmów. Podczas ogrzewania utlenia się, ciemnieje i rozkłada się. Lecytyna pochodzenia roślinnego ma łagodny, lekko orzechowy smak, przypominający olej sojowy. Lecytyna jest rozpuszczalna

w alifatycznych i aromatycznych węglowodorach, halogenowych węglowodorach, olejach mineralnych i kwasach tłuszczowych. Praktycznie nie rozpuszcza się w zimnych olejach roślinnych i zwierzęcych, rozpuszczalnikach polarnych i w wodzie. Poszczególne rodzaje lipidów i fosfolipidów można rozdzielić wykorzystując ich różnice w rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych (m. in. acetonie, etanolu, eterze etylowym, chloroformie, toluenie czy heksanie), np. fosfatydylocholina jest nierozpuszczalna w acetonie, co pozwala odróżnić ją od innych rodzajów fosfolipidów [36, 74, 75].

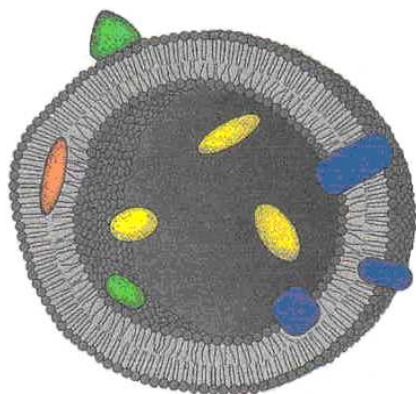
W produktach leczniczych lecytyna jest stosowana jako:

- ✓ substancja pomocnicza w preparatach podawanych drogą pozajelitową (emulsje, liposomy, mieszane micle, zawiesiny),
- ✓ wspomagająca substancja lecznicza lub suplement diety (drażetki, kapsułki, tonik), np. Vita Buerlecithin (Altana) - tonik, drażetki, Lecithin 1200 (Ortis) - kapsułki, Essentiale Forte (Nattermann, Sanofi-Aventis) - kapsułki,
- ✓ emulgator oraz składnik w preparatach do kąpieli pielęgnacyjno-leczniczych oraz w kremach, np. Balneum Intensiv (Hermal Kurt Herrmann),
- ✓ substancja dyspergująca i promotor wchłaniania substancji leczniczej z czopków,
- ✓ składnik aerozoli oraz preparatów podawanych w zaburzeniach oddychania u noworodków, np. Aeromax (GlaxoSmithKline), Infasurf (Forest Pharmaceuticals).

Lecytyna jest podstawowym składnikiem emulsji, liposomów oraz roztworów micelarnych.

Emulsje typu o/w od kilkudziesięciu lat są stosowane z dobrym skutkiem w żywieniu pozajelitowym. Są to, m. in. Abbolipid (Abbott), ClinOleic, Intralipid, Ivelip (Baxter), Omegaven, Lipovenos (Fresenius-Kabi), Lipofundin MCT (Braun) [24, 76, 77]. Preparaty te są dobrze tolerowane, a pacjenci otrzymują do 6 g lecytyny dziennie, nawet w długotrwałym żywieniu pozajelitowym. Standardowa emulsja składa się z oleju sojowego lub słonecznikowego (najczęściej w stężeniu 10% lub 20%), wody, lecytyny jajowej (emulgator w stężeniu 1,2% lub rzadziej 2,4%) oraz glicerolu lub ksylitolu (substancja doprowadzająca do izotonii). Emulsje te mogą być także wykorzystane jako nośniki substancji trudno rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wodzie. Wśród emulsji tłuszczowych są preparaty zawierające witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, np. Vitalipid (Fresenius Kabi) lub anestetyki, np. propofol - Plofed (*Polfa* Warszawa), Diprivan (Astra Zeneca), etomidat - Etomidat-Lipuro (Braun), a także diazepam - Diazepam-Lipuro (Braun). Substancje lecznicze muszą odznaczać się dobrą rozpuszczalnością w fazie olejowej, co niestety nie zawsze jest cechą substancji lipofilnych. W przypadku etomidatu postać emulsji pozwoliła na zmniejszenie działania drażniącego żył, przy niezmienionej farmakokinetyce i farmakodynamice [78].

Poza emulsjami, drugą formą leku zbudowaną z lecytyny są liposomy. Liposomy stanowią uniwersalny nośnik zarówno dla substancji hydrofilowych jak i lipofilowych (Rycina 6).



Charakter substancji leczniczej	Sposób i miejsce lokalizacji w liposomie
hydrofilowy	zamknięcie w wodnym rdzeniu
lipofilowy	inkorporacja w błonie
hydrofilowy	adsorpcja na powierzchni błony
amfifilowy	związanie w interfazie

Rycina 6. Schemat liposomu i lokalizacja inkorporowanych substancji leczniczych [79].

Liposomy to kuliste pęcherzyki wielkości 0,01-1,0 μm , których rdzeniem jest mikrokropelka wody, a otoczką podwójna warstwa fosfolipidów lub wielokrotność tej warstwy. Zamknięcie cząsteczki leku w liposomach zmienia często jego farmakokinetykę, co stanowi podstawę tzw. terapii celowanej, dzięki czemu możliwe jest ograniczenie toksyczności leku i zwiększenie skuteczności działania [78, 80]. Terapia celowana może dać szczególnie korzystne efekty w leczeniu chorób nowotworowych [7]. Liposomy nie tworzą się wyłącznie z lecytyny. Pęcherzyki liposomalne powstają w obecności cholesterolu lub innych dodatkowych surfaktantów. Niestety, zawiesina liposomów ulega destabilizacji z powodu wymiany fosfolipidów pod wpływem lipoprotein osocza (przede wszystkim HDL), a także może nastąpić wychwyt liposomów przez makrofagi. Aby przedłużyć czas krążenia liposomów w krwiobiegu pokrywa się ich powierzchnie hydrofilowymi polimerami (np. polioksyetylenoglikolem o m. cz. ok. 2000). Są to tzw. Stealth® liposomy (doksorubicyna - Doxil oraz Caelyx (Alza)) [81, 82]. Do produkcji liposomów używa się także syntetycznych fosfolipidów, jak np. w szczepionce zawierającej inaktywowane wirusy zapalenia wątroby typu A (HAVpur (Chiron Behring)) [78, 83, 84].

Pomimo, że fosfolipidy lecytyny mają charakter związków powierzchniowo czynnych, nie są samodzielnie wykorzystywane do solubilizacji micelarnej substancji leczniczych, głównie z tego powodu, że same nie rozpuszczają się w wodzie. Mieszane micelle są postacią leku otrzymaną przy pomocy dwóch surfaktantów - fosfolipidów (fosfatydylocholiny) oraz kwasów żółciowych. Sole kwasów żółciowych w tych układach

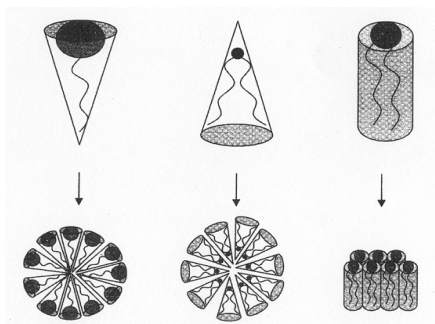
zapewniają stabilność miceli i solubilizują nierozpuszczalne w wodzie fosfolipidy [85]. Ich zdolność solubilizacyjna w stosunku do fosfatydylocholiny sojowej wzrasta w kolejności: cholan sodu < deoksychohan sodu < glikocholan sodu [86]. Mimo że sole kwasów żółciowych charakteryzują się silnymi właściwościami hemolitycznymi, dzięki interakcji z fosfolipidami wolna frakcja soli kwasów żółciowych ulega obniżeniu i właściwości te są ograniczone. Lecytyna sojowa, która w przeciwieństwie do lecytyny jajowej zawiera w swojej cząsteczce długie, nienasycone łańcuchy kwasów tłuszczowych, tworzy większe micle i bardziej ułatwia rozpuszczanie substancji leczniczej. Zdolność solubilizująca tych układów zależy od rodzaju fosfolipidów i soli kwasów żółciowych tworzących micle, stosunku molowego składników lipidowych, stężenia mieszanych miceli, pH, siły jonowej i temperatury układu oraz struktury chemicznej rozpuszczanej substancji [85, 87]. Aktualnie w lecznictwie dostępne są 4 preparaty zawierające mieszane micle utworzone przez fosfolipidy lecytyny sojowej i kwasy żółciowe: witamina K - Konakion MM (Roche), preparat wielowitaminowy - Cernevit (Baxter), diazepam - Valium MM (Roche), fosfolipidy stanowiące substancję leczniczą w uszkodzeniach wątroby - Essentiale N (Nattermann, Sanofi-Aventis) [24, 78]. W stosunku do liposomów mieszane micle posiadają tę przewagę, że ze względu na rozmiary cząstek (20 - 100 nm) nie są wychwytywane przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (RES - Reticulo-Endothelial System) [7].

Trwają też próby uzyskania nowych struktur fosfolipidowych, np. w formie sferycznych cząstek o strukturze plastra miodu, z zamkniętym wewnątrz roztworem substancji leczniczej. Stosując odpowiednie lipidy można kontrolować czas uwalniania leku (DepoCyt, DepoPur (SkyePharma)) [88, 89].

Lecytyna nie rozpuszcza się w wodzie, lecz tworzy dyspersje. Do tej pory w lecznictwie nie zastosowano jako nośnika substancji leczniczej wodnej dyspersji lecytyny - układu o nieskomplikowanej technologii wytwarzania, składającego się tylko z biozgodnych składników: wody, lecytyny oraz glicerolu (substancji doprowadzającej do izotonii). Prowadzone od kilku lat w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej AMG badania nad wodnymi dyspersjami wskazują na realne szanse ich zastosowania jako nośników dla leków podawanych drogą pozajelitową, mimo iż struktura tych układów nie jest dokładnie poznana. Prowadzone aktualnie badania, które wchodzić w zakres niniejszej pracy, mają na celu bliższe poznanie właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych tych układów.

Właściwości termodynamiczne uwodnionych fosfolipidów zależą od struktury cząsteczek i składu dyspersji, m. in. długości łańcucha węglowodorowego, obecności wiązań nienasyconych, miejsca przyłączenia kwasu tłuszczowego do glicerolu. Różnorodne struktury można uzyskać poprzez zmianę temperatury. Przejścia fazowe można regulować także przez kontrolę pH lub przez dodatek innych substancji [66].

W wyniku badań zjawiska polimorfizmu lipidów powstała koncepcja kształtu molekularnego, według której różnym cząsteczkom można przypisać różne kształty - zależne od stosunku powierzchni przekroju poprzecznego polarnej "główki" do przekroju poprzecznego obszaru hydrofobowych łańcuchów alkilowych. Rycina 7 przedstawia sposób upakowania w strukturach lipidowych, w tym również fosfolipidowych, w zależności od kształtu cząsteczki lipidu [66].



Rycina 7. Model geometryczny pokazujący sposób upakowania cząsteczek w micelach, odwróconych micelach i strukturach blaszkowych.

W celu ilościowego opisu kształtu cząsteczki lipidowej wprowadzono parametr upakowania (PP) [90]:

$$PP = \frac{V}{a \times l}$$

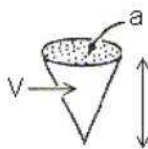
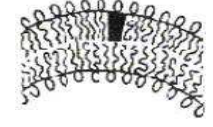
V - objętość części hydrofobowej cząsteczki

a - powierzchnia przekroju poprzecznego części polarnej cząsteczki

l - długość części hydrofobowej cząsteczki.

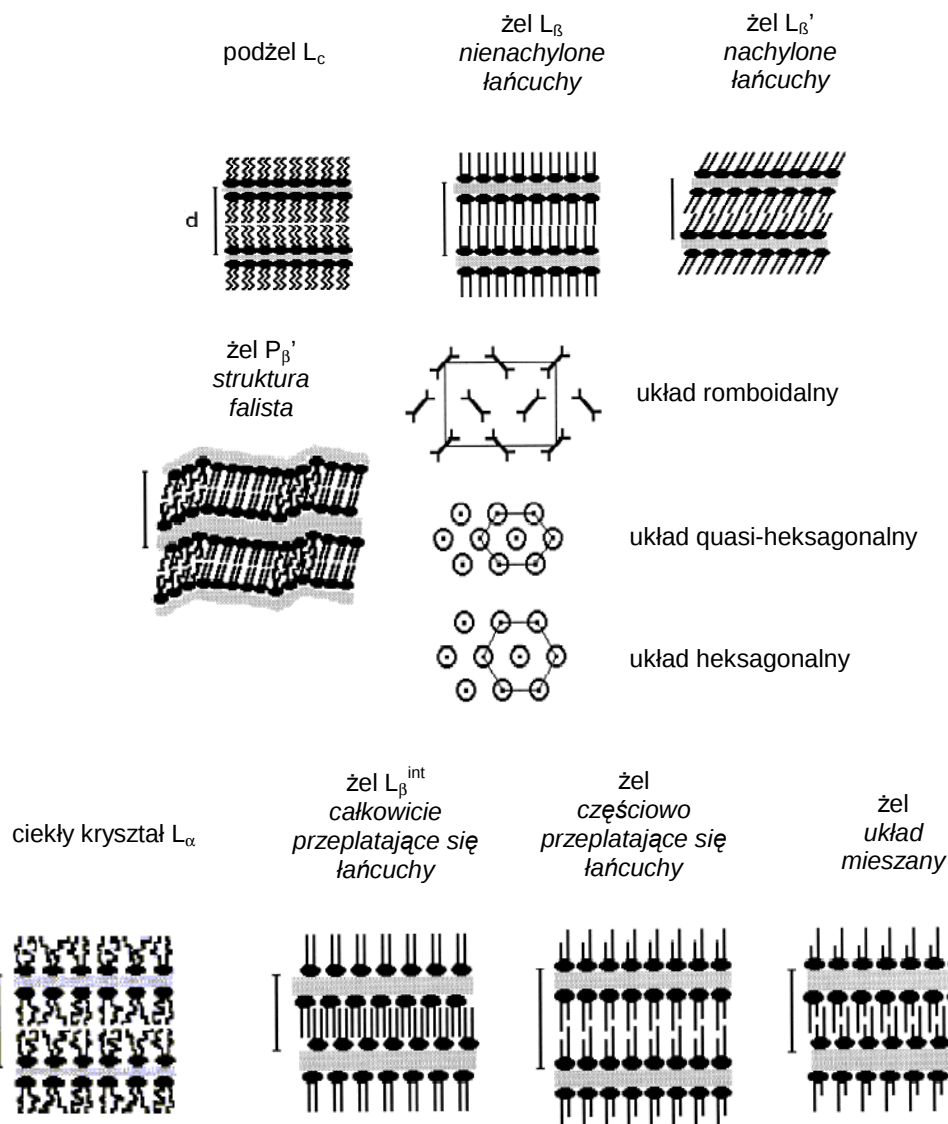
W zależności od kształtu i upakowania polarnej części lipidu oraz kwasów żółciowych wchodzących w skład makrocząsteczki, mogą powstawać różne struktury lipidowe: dwuwarstwa lipidowa, micelle lub odwrócona faza heksagonalna H_{II} (Tabela 10) [66].

Tabela 10. Parametr upakowania i wynikające z niego struktury agregatów lipidowych [91, 92]

PARAMETR UPAKOWANIA (PP)	LIPIDY	KSZTAŁT CZĄSTECZKI LIPIDOWEJ	PREFEROWANE FORMY STRUKTURALNE
<0,66	lizofosfolipidy wolne kwasy tłuszczowe mydła detergenty	 stożek	 sferyczna micela
0,66-0,5			 cylindryczna micela
0,5-1	fosfatydylocholina fosfatydyloinozytol fosfatydyloseryna fosfatydyloglicerol sfingomielina	 ścięty stożek	 elastyczna warstwa - liposom
1	lipidy z dwoma łańcuchami lipidowymi i małą powierzchnią grupy polarnej: fosfatydyloseryna + Ca^{2+}	 walec	 płaska warstwa podwójna
>1	lipidy z dwoma łańcuchami lipidowymi i małą powierzchnią grupy polarnej: fosfatydyloetanolamina fosfatydyloseryna (pH<4) kwas fosfatydowy cholesterol	 odwrócony ścięty stożek	 odwrócone micelle

Przykładowe struktury, jakie mogą tworzyć fosfolipidy przedstawia również Rycina 8.

Fosfatydylocholina (PC) zawierająca nasycone kwasy tłuszczowe o 15-22 atomach węgla cechuje się relatywnie dużym polimorfizmem. W zakresie temperatur 10 °C - 80 °C ulega trzem przemianom fazowym: $L_c \rightarrow L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$. Przypuszcza się, że dodatkowo pomiędzy fazą $P_{\beta'}$ i L_{α} pojawia się metastabilna dodatkowa faza $P_{\beta'}^{mst}$. Podczas ochładzania dyspersji fosfatydylocholiny zawierającej dwa łańcuchy węglowodorowe, każdy po 16 atomów węgla (PC 16:0/16:0), następuje przejście $L_{\beta'} \rightarrow L_c$ i zmiana ułożenia łańcuchów węglowodorowych z układu quasi-heksagonalnego do romboidalnego. Czas potrzebny na przemiany zależy od długości łańcuchów węglowodorowych i wynosi ok. 30 min dla PC 16:0/16:0 oraz ponad 1,5 roku dla PC 20:0/20:0. Dla nasyconych kwasów tłuszczowych temperatura przemian fazowych rośnie wraz z długością łańcucha



Rycina 8. Schemat faz lamelarnych występujących w wodnych układach fosfolipidów [93].

węglowodorowego w cząsteczkach fosfolipidów. Obecność wiązania podwójnego w łańcuchu węglowodorowym, szczególnie w konformacji *cis*, powoduje obniżenie temperatury przemian fazowych [93, 94].

Rodzaj łańcuchów acylowych wchodzących w skład fosfolipidów wyznacza ich temperaturę przejścia fazowego [80, 95-97]. Poniżej temperatury przejścia fazowego fosfolipidy pozostają w fazie stałej, zwanej fazą żelu krystalicznego, a ich łańcuchy acylowe są ściśle upakowane. Powyżej tej temperatury lipidy przechodzą w fazę ciekłego kryształu, a ich łańcuchy acylowe ulegają dezorganizacji. Cząsteczki lipidów mogą wtedy wykonywać szybkie ruchy w płaszczyźnie warstwy lipidowej [74, 92]. Wyznaczono średnie temperatury przemian fazowych dla lecytyny pochodzenia naturalnego. Dla lecytyny

z żółtka jaja kurzego temperatura przejścia z fazy żelu do ciekłego kryształu wynosi $-5,8 \pm 6,5$ °C, natomiast po uwodornieniu lecytyny sojowej temperatura wzrasta do 52 °C [93].

Pomimo różnorodności teoretycznych struktur jakie tworzą fosfolipidy (*Rycina 8*) brakuje w piśmiennictwie doniesień o strukturach wykrywanych w dyspersjach lecytyny w wodzie.

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Celem pracy było otrzymanie nowej postaci leku z substancją przeciwnowotworową - paklitakselem - przeznaczonej do podania we wlewie dożylnym. Słaba rozpuszczalność wielu substancji leczniczych w wodzie ogranicza możliwość ich zastosowania dożylnie i wciąż trwają poszukiwania substancji pomocniczych, które zwiększałyby ich rozpuszczalność w wodzie - jedynym rozpuszczalniku dopuszczonym do podawania we wlewie dożylnym. Przeprowadzone badania miały na celu uzyskanie roztworu solubilizowanego paklitakselu. Substancja ta dostępna jest aktualnie w lecznictwie w postaci preparatu Taxol i jego odpowiedników. Są to koncentraty do sporządzania roztworu do wlewu dożylnego, tworzone z użyciem solubilizatora Cremophoru EL. Ten surfaktant odpowiedzialny jest za działania niepożądane leku. Aby zredukować występujące reakcje nadwrażliwości, wszyscy pacjenci przed podaniem roztworów paklitakselu otrzymują premedykację, co stanowi niedogodność tej terapii. Z tego powodu celowe jest poszukiwanie innego sposobu zwiększania rozpuszczalności paklitakselu w wodzie.

Ponieważ wprowadzenie do lecznictwa nośnika z nową substancją pomocniczą może trwać nawet 10 lat, założono, że nowy układ będzie zawierał tylko substancje już stosowane w produktach leczniczych podawanych pozajelitowo. Nowa postać leku z paklitakselem powinna odpowiadać wymaganiom stawianym płynom dożylnym pod względem pH, ciśnienia osmotycznego oraz jałowości. Forma fizyczna nowego układu powinna umożliwiać zastosowanie we wlewie dożylnym, dlatego brano pod uwagę tylko formę roztworu, dyspersji micelarnej lub emulsji submikronowej.

Jako podstawową substancję pomocniczą pełniącą rolę solubilizatora dla paklitakselu wybrano lecytynę jajową i sojową. Ze względu na swój skład i obecność głównego składnika - fosfatydylocholiny - we wszystkich błonach komórkowych, lecytyna uważana jest za biogodną i bezpieczną substancją w preparatach podawanych dożylnie. Fosfolipidy są już składnikami stosowanych w lecznictwie emulsji, liposomów oraz mieszanych miceli i w niektórych przypadkach mogą ograniczać toksyczność leku lub innych substancji pomocniczych.

Przedmiotem badań w niniejszej pracy jest przede wszystkim bezpostaciowa forma paklitakselu. Modyfikacja formy fizycznej substancji ma duży wpływ na jej rozpuszczalność. Dzięki opracowanej metodzie otrzymywania bezpostaciowej formy paklitakselu uzyskano już jego zwiększoną rozpuszczalność w pewnych nośnikach (0,45 mg/ml), a wyniki tych doświadczeń są przedmiotem patentu [94]. Założono, że stężenie paklitakselu w nowym preparacie do wlewu dożylnego powinno być zbliżone do stosowanego aktualnie w lecznictwie (ok. 100 mg/100 ml), a nowy układ powinien charakteryzować się przynajmniej 24-godzinną trwałością fizykochemiczną pozwalającą na podanie leku pacjentowi.

Oprócz właściwego doboru substancji pomocniczych i postaci leku, przeprowadzone badania miały również na celu modyfikację metod otrzymywania tych postaci, tak by było możliwe otrzymanie stabilnych preparatów. Jako podstawową technikę modyfikującą układy zastosowano liofilizację.

Celem przeprowadzonych badań było ponadto uzyskanie informacji na temat właściwości fizycznych nowych nośników, w których, szczególnie podczas wyjaławiania termicznego oraz przechowywania, mogą zachodzić zmiany strukturalne wpływające na ich zdolności solubilizacyjne.

Nowe nośniki wymagają oceny ich toksyczności. Dodatkowo należy poznać ich wpływ na kinetykę substancji leczniczej. Z tego względu ważny etap miały stanowić badania *in vivo* na zwierzętach. Zdecydowano, że układ, który zapewni rozpuszczalność paklitakselu 100 mg/100 ml i będzie charakteryzował się trwałością co najmniej 24 h zostanie podany zwierzętom, a następnie porównany z lekiem dostępnym w leczeniu. Konieczne są też badania toksyczności ostrej i tolerancji miejscowej nowych preparatów. Obecność w układach cząstek koloidalnych może spowodować wystąpienie urazów nabłonka, a z drugiej strony może zmniejszyć toksyczność paklitakselu na skutek zmiany farmakokinetyki.

III. METODYKA

1. ODCZYNNIKI, MATERIAŁY I APARATURA

1.1. Odczynniki i rozpuszczalniki

- Acetonitryl (*Merck*, Darmstadt, Niemcy)
- Alkohol etylowy bezwodny 99,8% (*POCH*, Gliwice)
- Azot
- Bufor fosforanowy (0,067 mol/l) pH 7,4 o składzie:
 - sodu diwodorofosforan bezwodny 1,6 g
 - sodu wodorofosforan bezwodny 7,6 g
 - woda do 1000,0 ml
- Chlorek benzalkoniowy (*FeF Chemicals*, Køge, Dania)
- 0,9% roztwór chlorku sodu do wstrzykiwań (*Polfa Lublin*, Lublin)
- Cremophor EL - polioksyetylenowany olej rącznikowy (*Fluka Chemie*, Buchs, Szwajcaria)
- Deoksycholan sodu (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Niemcy)
- Diazepam (otrzymano z *Warszawskich Zakładów Farmaceutycznych Polfa*)
- 1,4-dioksan (*Merck*, Darmstadt, Niemcy)
- Faza do chromatografii paklitakselu (% obj.):
 - acetonitryl 57
 - metanol 5
 - woda 38
- Faza do chromatografii paklitakselu ekstrahowanego z krwi królików (% obj.):
 - acetonitryl 35
 - metanol 25
 - woda 40
- Glicerol 86% (*POCH*, Gliwice)
- Lipoid E80 - lecytyna jajowa (*Lipoid*, Ludwigshafen, Niemcy) - *Załącznik 1*
- Lipoid EPC - fosfatydylocholina (*Lipoid*, Ludwigshafen, Niemcy)
- Lipoid S100 - lecytyna sojowa (*Lipoid*, Ludwigshafen, Niemcy) - *Załącznik 2*
- Metanol cz.d.a. (*POCH*, Gliwice)
- Metanol do chromatografii (HPLC) (*POCH*, Gliwice)
- Octan etylu do chromatografii (HPLC) (*Merck*, Darmstadt, Niemcy)
- Paklitaksel (otrzymano z *Warszawskich Zakładów Farmaceutycznych Polfa*)
- PEG 6000 - makrogol/glikol polietylenowy (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Niemcy)
- Sodu diwodorofosforan bezwodny cz.d.a. (*POCH*, Gliwice)
- Sodu wodorofosforan bezwodny cz.d.a. (*POCH*, Gliwice)

- Span 80 - monooleinian sorbitanu (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Niemcy)
- Synperonic F68 - poloksamer/kopolimer polietylenoglikolu i polipropylenoglikolu (4:1) (*Serva Electrophoresis*, Heidelberg, Niemcy)
- Taxol - koncentrat do przygotowania roztworu do wlewu dożylnego (6 mg/ml) (*Bristol-Myers Squibb*, Nowy Jork, USA)
- TEMPOL - 4-hidroksy-2,2,6,6-tetrametylo-1-piperydyno-1-oksyl (*Alexis Biochemicals*, Lozanna, Szwajcaria)
- Tween 80 - polisorbitat 80/monooleinian polioksyetylenosorbitanu (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Niemcy)
- Woda oczyszczona przez wymianę jonową i odwróconą osmozę (*Elix 3*, *Millipore*, Bedford, USA)

1.2. Materiały

- Filtry membranowe z octanu celulozy o średnicy porów 0,8 μm (*Sartorius*, Goettingen, Niemcy)
- Filtry membranowe „strzykawkowe” jałowe z mieszanych estrów celulozy Millex-GS Millipore o średnicy porów 0,22 μm (*Millipore*, Bedford, USA)
- Igły jednorazowe jałowe typu Luer 0,7 $\times$ 30 mm (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Niemcy)
- Infuzor LV 2 ml/h (*Baxter*, Warszawa)
- Kaniula dożylna 0,8 $\times$ 25 mm (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Niemcy)
- Kolumna chromatograficzna z wypełnieniem oktadecylokrzemowym (C18), o wielkości ziaren wypełnienia - 5 μm , wymiary - 250 mm $\times$ 4,6 mm (*Vydac*, Hesperia, USA)
- Końcówki szklane do mikropipety Drummond 20-100 μl (*Drummond Scientific Company*, Broomall, USA)
- Mieszadélko elektromagnetyczne PTFE (*VIT-LAB*, Niemcy)
- Oprawka do filtra D-3400 (*Sartorius*, Goettingen, Niemcy)
- Probówki typu Chromacol 100 mm $\times$ 13 mm z uszczelką PTFE/silikon i kapslém (*Chromacol*, Welwyn Garden City, Wielka Brytania)
- Probówki do krwi Vacutainer: CAT, K2E, K3E, LH (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Niemcy)
- Przedłużacz do pompy strzykawkowej (*Polfa Lublin*, Lublin)
- Strzykawka do insuliny z nakładaną igłą - 1 ml (*Polfa Lublin*, Lubin)
- Strzykawki polipropylenowe typu Luer - 20 ml (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Niemcy)

1.3. Aparatura

- Dezintegrator ultradźwiękowy typ UD-20 (*Zakład Doświadczalny Techpan, Warszawa*)
- Dyfraktometr laserowy Mastersizer/E (*Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania*)
- Homogenizator wysokociśnieniowy Rannie typ 8.30H (*APV Gaulin, Hilversum, Holandia*)
- Komora laminarna Lamil Plus do pracy z cytostatykami (*Karstulan Metalli, Karstula, Finlandia*)
- Liofilizator 2-4 Alpha (*Christ, Osterode, Niemcy*) z pompą próżniową - typ RZ-5 (*Vaccumbrand, Wertheim, Niemcy*)
- Mieszadło elektromagnetyczne z łaźnią wodną IKA (*Werke KG, Staufen, Niemcy*)
- Mieszadło szybkoobrotowe Ultra-Turrax T25 (*Janke&Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Niemcy*)
- Mikropipeta 20-100 µl (*Drummond Scientific Company, Broomall, USA*)
- Mikroskop Motic B1-220A (*Motic Deutschland, Wetzlar, Niemcy*) z kamerą Panasonic - model GP-KR222E (*Matsushita Communication Industrial, Japonia*)
- Osmometr automatyczny (*Knauer, Bad Homburg, Niemcy*)
- Pehametr typ 350 (*Orion-Research, Boston, USA*) z elektrodą kombinowaną ERH-11 (*Zakład Produkcji Elementów Aparatury Fizykochemicznej-Hydromet, Warszawa*)
- Pompa strzykawkowa Duet 20/50 (*Kwapisz, Warszawa*)
- Pipeta automatyczna 0,2-1 ml (*HTL, Warszawa*)
- Pipeta automatyczna 2-5 ml (*HTL, Warszawa*)
- Spektrofotometr UV/VIS - Jasco V-530 (*Jasco, Tokio, Japonia*)
- Spektrometr ESR - MiniScope MS 200 z oprogramowaniem MiniScope Control, Multiplot oraz Analysis (*Magnettech, Berlin, Niemcy*)
- Sterylizator parowy typ ASHE (*Spółdzielnia Pracy Mechaników, Warszawa*)
- Waga analityczna typ PRLT A14 (*Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Gdańsk*)
- Waga analityczna elektroniczna WAX 62 (*Radwag-Zakład Mechaniki Precyzyjnej, Radom*)
- Waga laboratoryjna WPS 1200 (*Radwag-Zakład Mechaniki Precyzyjnej, Radom*)
- Wirówka Heraeus (*Christ, Osterode, Niemcy*)
- Wirówka WF 6 (*Mechanika Precyzyjna, Warszawa*)

- Wysokosprawny chromatograf cieczowy (*Merck Hitachi*, Darmstadt, Niemcy):
 - integrator D-12500AD
 - detektor UV-Vis L-4250
 - pompa L-6200A
- Wyrząsarka do probówek typu Vortex (*Dom Handlowy Nauki*, Warszawa)
- Wyrząsarka mechaniczna z termostatowaną łaźnią wodną typ 357 (*Elpan*, Lubawa)
- Zamrażarka typ TZ 121 E (*PPSD*, Żagań)
- Zestaw do sączenia pod zwiększonym ciśnieniem (*Sartorius*, Goettingen, Niemcy).

Wszystkie czynności związane z przygotowaniem, badaniem i podawaniem zwierzętom preparatów zawierających paklitaksel wykonywano zgodnie z obowiązującymi procedurami postępowania z lekami cytostatycznymi.

2. OTRZYMYWANIE AMORFICZNEJ POSTACI PAKLITAKSELU

Paklitaksel amorficzny otrzymywano metodą wykorzystującą technikę suszenia sublimacyjnego, opatentowaną przez Akademię Medyczną w Gdańsku oraz Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne *Polfa* [98]. Podstawowy roztwór paklitakselu przeznaczony do liofilizacji miał następujący skład:

- ✓ paklitaksel 30 mg
- ✓ dioksan 8,0 ml
- ✓ woda 2,0 ml

Liofilizowano od 2 do 10 ml wodno-organicznego roztworu paklitakselu i w rezultacie otrzymywano od 6 do 30 mg liofilizowanego paklitakselu w fiolce. Parametry procesu suszenia sublimacyjnego paklitakselu przedstawia *Tabela 11*.

Tabela 11. Etapy i parametry procesu liofilizacji

ETAP		TEMPERATURA PÓŁKI [°C]	CZAS UTRZYMYWANIA TEMPERATURY [h]	CIŚNIENIE [mbar]
1.	zamrażanie	-40	2	1013
2.	suszenie właściwe	-40	1	0,08
		-20	5	
		-5	12	
		+5	12	
		+20	12	
3.	suszenie dodatkowe	+35	2	

3. SPORZĄDZANIE WODNYCH DYSPERSJI LECYTINY (WDL)

Przygotowano dyspersje lecytyny jajowej oraz sojowej (5% i 10%) metodą, która została wcześniej opracowana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej [99]. Skład układów podstawowych przedstawia *Tabela 12*.

Zastosowana w badaniach lecytyna jajowa (Lipoid E80) zawierała zgodnie z deklaracją producenta od 80% do 85% fosfatydylocholiny, natomiast lecytyna sojowa (Lipoid S100) zawierała nie mniej niż 94% fosfatydylocholiny (*Załącznik 1 i 2*).

Składniki dyspersji umieszczano w kolbie stożkowej i mieszano ogrzewając na termostatowanym mieszadle elektromagnetycznym (60 °C, 60 min). W kolejnych etapach dyspersję mieszano za pomocą mieszadła szybkoobrotowego Ultra-Turrax (8000 obr./min, 2 min) i poddano działaniu ultradźwięków (20 kHz, 10 min). Dyspersję sączono przez sączek z octanu celulozy o średnicy porów 0,8 µm i dozowano do fiolek szklanych w atmosferze azotu (po 10 ml lub 20 ml). Fiolki zamykano gumową zatyczką i kapslowano. Wyjaławiano w autoklawie w warunkach standardowych (121 °C, 20 min).

Niektóre dyspersje lecytyny jajowej oraz sojowej (**e4**, **s4**) zostały poddane, przed procesem sączenia, homogenizacji wysokociśnieniowej (500 bar, 8 cykli).

Tabela 12. Skład [g] sporządzanych wodnych dyspersji lecytyny jajowej i sojowej (WDL)

SKŁADNIKI	PODSTAWOWA WDL		PODSTAWOWA IZOTONICZNA WDL			
LECYTYNA JAJOWA						
symbol układu	e1	e2	e3	e4	e5	e6
lecytyna jajowa	5,0	10,0	5,0			10
glicerol 86%	-		2,76		-	2,76
woda	do 100,0		do 100,0	do 100,0	-	do 100,0
bufor fosforanowy *	-		-	-	do 100,0	-
homogenizacja	-		-	+	-	-
LECYTYNA SOJOWA						
symbol układu	s1	s2	s3	s4		s5
lecytyna sojowa	5,0	10,0	5,0			
glicerol 86%	-		2,76			-
woda	do 100,0		do 100,0	do 100,0		-
bufor fosforanowy *	-		-	-		do 100,0
homogenizacja	-		-	+		-

* 0,067 mol/l, pH 7,4

W celu uzyskania układów o stężeniu lecytyny 3% (**e3''**) oraz 1% (**e3'**, **s3'**), dyspersje lecytyny jajowej i sojowej (**e3**, **s3**) rozcieńczano wodą z dodatkiem glicerolu.

Prowadzono też badania z WDL poddawaną liofilizacji. W tym celu dyspersję lecytyny jajowej (**e2**) dozowano w ilości 5 ml do fiolek szklanych poj. 20 ml i poddawano procesowi liofilizacji zgodnie ze schematem przedstawionym w Tabeli 11. Przed dalszymi badaniami liofilizat dyspergowano w 15 ml wody uzyskując WDL o stężeniu 3,3% (**Le**).

W ten sam sposób jak WDL sporządzono dyspersję zawierającą oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową 5% (**f**) (Lipoid EPC - minimum 98% fosfatydylocholiny) w celu porównania jej właściwości fizykochemicznych z dyspersjami lecytyny jajowej i sojowej. Układ zawierał wodę oraz glicerol (2,76%) i został wykonany z pominięciem procesu homogenizacji.

W celu oceny powtarzalności metody sporządzania WDL, dyspersje zawierające lecytynę jajową (**e4**, **s4**) wykonano w różnych terminach oraz z lecytyny pochodzącej z 3 trzech serii producenta.

4. SPORZĄDZANIE MIESZANYCH MICELI SKŁADAJĄCYCH SIĘ Z LECYTINY JAJOWEJ ORAZ DEOKSYCHOLANU SODU

W fiolkach szklanych poj. 20 ml mieszano 10% WDL (**e2**, Tabela 12) oraz roztwory deoksycholanu sodu o odpowiednim stężeniu i uzupełniano wodą do 10 ml. Otrzymano w ten sposób 2 układy o stężeniu lecytyny jajowej i deoksycholanu sodu odpowiednio:

- ✓ 1,1% - 1,1% (**ed1**)
- ✓ 2% - 0,5% (**ed2**).

Pozostałe układy otrzymywano z pośrednim etapem liofilizacji. W fiolkach szklanych poj. 20 ml mieszano 10% WDL (**e2**, Tabela 12) oraz roztwory deoksycholanu sodu o odpowiednim stężeniu i uzupełniano, jeśli to konieczne, wodą do 5 ml. Stosunek wagowy lecytyny jajowej do deoksycholanu sodu wynosił 1:1 lub 4:1. Poddawano je liofilizacji zgodnie ze schematem przedstawionym w Tabeli 11. Przed dalszymi badaniami liofilizat dyspergowano w wodzie, uzyskując układy o stężeniu lecytyny jajowej i deoksycholanu sodu odpowiednio:

- ✓ 1,1% - 1,1% (**Led1**)
- ✓ 2% - 0,5% (**Led2**)
- ✓ 2% - 2% (**Led3**)
- ✓ 3% - 3% (**Led4**)
- ✓ 3% - 0,75% (**Led5**).

5. SPORZĄDZANIE NOŚNIKA Z LECYTYNĄ JAJOWĄ ORAZ SPANEM

W fiolkach szklanych poj. 20 ml mieszano 4 ml 10% WDL (**e2**, *Tabela 12*) oraz 1 ml 10% roztworu Spanu 80 (**S**). Układy poddawano liofilizacji zgodnie ze schematem przedstawionym w *Tabeli 11*. Przed dalszymi badaniami liofilizat dyspergowano w wodzie, uzyskując układ o stężeniu lecytyny jajowej i Spanu 80 odpowiednio: 3% - 0,75% (**LeS**)

6. WSPÓŁLIOFILIZACJA PAKLITAKSELU Z SUBSTANCJAMI POMOCNICZYMI

6.1. Przygotowanie układów współliofilizowanych

W fiolkach szklanych poj. 20 ml umieszczano 10% WDL (**e2** lub **s2**, *Tabela 12*) lub mieszano 10% WDL (**e2** lub **s2**) i wodne roztwory pozostałych substancji pomocniczych o odpowiednim stężeniu i uzupełniano, jeśli to konieczne, wodą do 5 ml. Następnie dodawano powoli, cały czas mieszając, 2,5 ml roztworu paklitakselu w dioksanie, zawierającego od 5 do 30 mg paklitakselu. Układy poddawano liofilizacji zgodnie ze schematem przedstawionym w *Tabeli 11*. Zawartość paklitakselu i pozostałych substancji pomocniczych w otrzymanych liofilizatach przedstawia *Tabela 13*.

6.2. Wielokrotna liofilizacja

W fiolkach szklanych poj. 20 ml mieszano 10% WDL (**e2**, *Tabela 12*) oraz wodny roztwór deoksyholanu sodu i uzupełniano wodą do 5 ml. Następnie dodawano powoli, cały czas mieszając 2,5 ml roztworu paklitakselu w dioksanie. Układy zawierały 90 mg lecytyny jajowej, 72 mg deoksyholanu sodu oraz 9 mg paklitakselu i poddawano je jednokrotnej, dwukrotnej, trzykrotnej i czterokrotnej liofilizacji zgodnie ze schematem przedstawionym w *Tabeli 11*. Przed każdym kolejnym suszeniem do liofilizatu dodawano 9 ml wody lub 20% roztworu dioksanu i otrzymaną dyspersję poddawano homogenizacji szybkoobrotowej (8000 obr./min, 3 min).

Tabela 13. Skład liofilizatów zawierających paklitaksel (P)

SYMBOL	SKŁADNIKI *	ILOŚĆ [mg]	STOSUNEK WAGOWY
LeP1 LeP2 LeP3 LeP4	e:P	166:5 330:5 500:15 500:30	33,2:1 66:1 33,3:1 16,6:1
LedP1 LedP2 LedP3 LedP4 LedP5 LedP6 LedP7 LedP8	e:d:P	50:50:20 100:20:20 100:50:20 100:80:20 100:150:20 166:166:30 200:200:20 250:250:30	2,5:2,5:1 5:1:1 5:2,5:1 5:4:1 5:7,5:1 5,3:5,3:1 10:10:1 8,3:8,3:1
LepP1 LepP2	e:p:P	330:66:10 330:165:10	33:6,6:1 33:16,5:1
LemP	e:m:P	330:100:10	33:10:1
LebP	e:b:P	330:10:10	33:1:1
LsP	s:P	330:10	33:1
LsdP1 LsdP2	s:d:P	250:125:20 250:250:20	12,5:6,25:1 12,5:12,5:1
LspP	s:p:P	330:66:10	33:6,6:1

* e - lecytyna jajowa, s - lecytyna sojowa, d - deoksycholan sodu, p - poloksamer F68, m - PEG 6000, b - chlorek benzalkoniowy

7. BADANIE ROZPUSZCZALNOŚCI PAKLITAKSELU W NOŚNIKACH

7.1. Badanie rozpuszczalności paklitakselu amorficznego i krystalicznego

Rozpuszczalność paklitakselu amorficznego i krystalicznego badano w nośnikach nieliofilizowanych oraz w nośnikach liofilizowanych i zdyspergowanych uprzednio w odpowiednim rozpuszczalniku. Po dodaniu nośnika do paklitakselu układy delikatnie mieszano przez zawirowanie i wielokrotne odwracanie fiołki przez 3-5 min ($t=0$). Następnie w celu określenia zmian w rozpuszczalności zawiesinę wytrząsano przez 24 h przy użyciu wytrząsarki mechanicznej z termostatowaną łąnią wodną w temperaturze pokojowej (20 °C - 25 °C).

Niektóre układy pozostawiono na 24 h bez wytrząsania.

Po dodaniu rozpuszczalnika sprawdzano, czy nie nastąpiło całkowite rozpuszczenie paklitakselu.

7.1.1. Nośniki nieliofilizowane

Do fiołki zawierającej amorficzną formę paklitakselu przygotowaną zgodnie z opisem przedstawionym w p. 2, dodawano:

- dyspersję lecytyny jajowej (1% - **e3'**, 3% - **e3''**, 5% - **e3**, **e4**) lub
- dyspersję lecytyny sojowej (1% - **s3'**, 5% - **s3**, **s4**).

Do fiołki zawierającej krystaliczną formę paklitakselu dodawano:

- dyspersję lecytyny jajowej (3% - **e3''**, 5% - **e3**, 10% - **e6**) lub
- nośniki nieliofilizowane zawierające mieszane micelle (**ed1**, **ed2**).

7.1.2. Nośniki liofilizowane

W przypadku liofilizowanych nośników dla paklitakselu (p. 3, 4 i 5) w pierwszej kolejności do liofilizatu dodawano jeden z wymienionych poniżej rozpuszczalników:

- wodę,
- wodę z glicerolem (2,76%),
- 1% roztwór poloksameru F68,
- 1,7% roztwór Tweenu 80.

Odtworzone dyspersje dodawano do amorficznego paklitakselu. Do krystalicznego paklitakselu dodawano tylko nośniki zawierające mieszane micelle (p. 4).

7.2. Badanie rozpuszczalności paklitakselu współlioofilizowanego z substancjami pomocniczymi oraz wielokrotna współlioofilizacja

Jako rozpuszczalniki dla układów zawierających paklitaksel i poddanych liofilizacji, których przygotowanie opisano w p. 6.1, stosowano:

- wodę,
- wodę z glicerolem (2,76%),
- 1% roztwór poloksameru F68,
- 10% lub 20% emulsję dożylną Ivelip.

Do fiołki z liofilizatem dodawano 10 lub 15 ml rozpuszczalnika.

W przypadku układów poddawanych wielokrotnej liofilizacji (p. 6.2), do liofilizatu, po zakończeniu wszystkich cykli suszenia, dodawano 9 ml rozpuszczalnika, którym była woda.

Po dodaniu rozpuszczalnika układy delikatnie mieszano przez zawirowanie i wielokrotne odwracanie fiołki przez 3-5 min ($t=0$). Następnie w celu określenia zmian w rozpuszczalności zawieszinę wytrząsano przez 24 h przy użyciu wytrząsarki mechanicznej z termostatowaną łąnią wodną w temperaturze pokojowej (20 °C - 25 °C).

7.3. Pobieranie i przygotowanie prób do analizy

Układy poddawano analizie bezpośrednio po dodaniu odpowiedniego rozpuszczalnika do układu z paklitakselem ($t=0$) oraz po 6 h i 24 h. Pobierano ok. 2 ml zawiesiny i wirowano (10 min, 930×g). Ilość rozpuszczonego paklitakselu obecnego w supernatancie analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC) (p. 8). Supernatant rozcieńczano fazą ruchomą tak, aby uzyskać stężenie paklitakselu około 10 µg/ml.

7.4. Ocena wizualna oraz obserwacje mikroskopowe

Układy z rozpuszczonym paklitakselem obserwowano wizualnie, zwracając uwagę na barwę, homogenność i wytrącanie osadu. Pod mikroskopem optycznym (powiększenie 400-krotne) określano obecność, wielkość i kształt aglomeratów w nośniku oraz cząstek wytrąconej substancji leczniczej.

8. ANALIZA ILOŚCIOWA PAKLITAKSELU

Stężenie paklitakselu w otrzymanych próbkach oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych.

Warunki analizy [100]:

- faza ruchoma: acetonitryl/metanol/woda (58:5:37),
- kolumna: Vydac, 250×4,6 mm, z wypełnieniem oktadecylokrzemowym (C18) i wielkością ziaren wypełnienia 5 µm,
- szybkość przepływu: 1,0 ml/min,
- detekcja: 228 nm.

Na kolumnę chromatograficzną наносzono za pomocą pętli dozującej 20 µl badanego roztworu lub roztworu wzorcowego. Czas retencji paklitakselu wynosił ok. 3,5 min.

W celu określenia zależności powierzchni piku od stężenia paklitakselu przygotowano roztwory wzorcowe paklitakselu w metanolu o stężeniu: 10, 1, 0,5, 0,2, 0,1 µg/ml. Oceniano liniowość i powtarzalność metody. Niedające się oznaczyć stężenie paklitakselu w nastrzykiwanym roztworze wynosiło 0,05 µg/ml, a granicę oznaczalności stanowiło stężenie 0,1 µg/ml.

Zawartość paklitakselu w roztworze badanym [µg/ml] obliczano ze wzoru:

$$C = \frac{C_w \times A_p}{A_w}$$

C - stężenie paklitakselu w analizowanym roztworze [$\mu\text{g/ml}$]

C_w - stężenie paklitakselu w roztworze wzorcowym [$\mu\text{g/ml}$]

A_p - pole powierzchni piksu na chromatogramie roztworu badanego [tys.]

A_w - pole powierzchni piksu na chromatogramie roztworu wzorcowego [tys.]

Przy obliczaniu stężenia paklitakselu w badanych układach uwzględniano rozcieńczanie prób przed analizą HPLC.

W celu określenia dokładności i specyficzności metody dla roztworów WDL przygotowano dodatkowe próbki. W dwóch kolbkach miarowych poj. 10 ml umieszczono po 100 μl supernatantu uzyskanego po wirowaniu 3% WDL (10 min, 930 $\times$ g). Zawartość pierwszej rozcieńczono fazą ruchomą, a do drugiej dodano 100 μl metanolowego roztworu paklitakselu o stężeniu 1 mg/ml i również rozcieńczono fazą ruchomą. Wykonano chromatogramy i porównano z chromatogramem wzorcowego roztworu paklitakselu w metanolu (10 $\mu\text{g/ml}$).

9. CHARAKTERYSTYKA WODNYCH DYSPERSJI LECYTINY I FOSFOLIPIDÓW

Podjęto próbę bliższej charakterystyki fizykochemicznej układów WDL o stężeniu fosfolipidów 5%. Metodę sporządzania układów opisano w punkcie 3. Właściwości wodnych dyspersji lecytyny jajowej i sojowej, w których badano rozpuszczalność paklitakselu, porównywano z dyspersjami oczyszczonej fosfatydylocholiny. Obserwacje prowadzono dla **e3**, **e4**, **e5**, **s3**, **s4** i **s5** (Tabela 12) oraz dyspersji oczyszczonej fosfatydylocholiny (p. 3) po sporządzeniu układów, w trakcie przechowywania w temp. 37 °C (do 72 h) oraz w temperaturze pokojowej 6 lub 18 miesięcy bez dostępu światła.

9.1. Pomiar pH

Wartość pH mierzono potencjometrycznie zanurzając elektrodę kombinowaną pehametru w dyspersji.

Pomiary powtarzano trzykrotnie dla każdej próby, a uzyskany wynik stanowiła średnia arytmetyczna z trzech niezależnych pomiarów.

9.2. Pomiar wielkości cząstek w WDL

Wielkość zdyspergowanych cząstek mierzono metodą dyfrakcji laserowej, aparatem pozwalającym na detekcję cząstek o wielkości od 0,05 μm do 80 μm . Na pojedynczy pomiar zużywano od 10 ml do 100 ml dyspersji. Układy oceniano na podstawie następujących parametrów:

- $d_{(0,5)}$ - mediana średnicy - maksymalna średnica 50% cząstek obecnych w układzie (poniżej tej wartości zawiera się 50% cząstek)
- $d_{(0,9)}$ - maksymalna średnica 90% cząstek obecnych w układzie
- $d_{\max}$ - średnica największych wykrywanych cząstek.

9.3. Pomiar absorbancji

W celu porównania klarowności dyspersji lecytyn i fosfatydylocholiny oraz oceny tendencji do sedymentacji cząstek w układach, dokonano pomiaru absorbancji poszczególnych dyspersji. Każdy układ rozcieńczano 50-krotnie wodą. Pomiaru dokonywano w kuwetach kwarcowych (1 cm) w spektrofotometrze UV/VIS wobec buforu fosforanowego (układy zawierające bufor fosforanowy) lub wody (pozostałe układy) jako odnośnika. Wartość absorbancji mierzono przy długości fali 540 nm.

9.4. Ocena wizualna oraz obserwacje mikroskopowe

Układy obserwowano wizualnie, zwracano uwagę na barwę, homogenność, sedymentację cząstek fosfolipidowych podczas przechowywania oraz wielkość i kształt cząstek widocznych pod mikroskopem optycznym wyposażonym w kamerę (powiększenie 400-krotne).

9.5. Wirowanie

Wybrane preparaty poddano wirowaniu (930×g) przez 5 min, w celu określenia ilości powstałego osadu, potwierdzającego stopień niestabilności fizycznej danego układu.

9.6. Analiza ESR

Badanie ESR (Electron Spin Resonance - Elektronowy Rezonans Spinowy) wykonano na Uniwersytecie Marcina Lutra w Halle (Niemcy) w Katedrze Biofarmacji oraz w Katedrze Technologii Farmaceutycznej.

Do 1 ml dyspersji dodawano 50 µl wodnego roztworu TEMPOLU (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylo-1-piperydino-1-oksyl - donor niesparowanych elektronów) o stężeniu 0,2 mM, dokładnie mieszano i poddawano analizie. Spektrometr pracował w paśmie X (9,5 GHz).

10. BADANIA *IN VIVO* NA KRÓLIKACH - OCENA WPŁYWU NOŚNIKA NA FARMAKOKINETYKĘ PAKLITAKSELU, OBSERWACJA ZACHOWANIA ZWIERZĄT, BADANIE TOLERANCJI MIEJSCOWEJ PREPARATU

Badania przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii Akademii Medycznej w Gdańsku.

10.1. Przygotowanie preparatów do badania *in vivo*

Królikom podawano 4 preparaty:

- ✓ *PTX-WDL* - nowy preparat paklitakselu (100 mg/100 ml),
- ✓ *Taxol* - preparat referencyjny - lek oryginalny (100 mg/100 ml),
- ✓ *WDL* - placebo - 5% podstawowa izotoniczna jajowa *WDL* - nośnik nowego preparatu,
- ✓ *C-E* - placebo - Cremophor EL z bezwodnym alkoholem etylowym - nośnik paklitakselu w preparacie referencyjnym.

Preparat z paklitakselem, który podawano zwierzętom wybrano na podstawie badań rozpuszczalności. Składał się on z amorficznego paklitakselu, którego otrzymywanie opisano w p. 2 (*Metodyka*), rozpuszczonego w izotonicznej jajowej 5% *WDL* (*PTX-WDL*). Wyjałowioną termicznie dyspersję (**e4**, *Tabela 12*) przed dodaniem do substancji leczniczej sączono dodatkowo przez jałowy sączek z octanu celulozy o średnicy porów 0,8 µm.

Preparat placebo *WDL* przed podaniem królikom również sączono przez jałowy sączek z octanu celulozy o średnicy porów 0,8 µm.

Oryginalny koncentrat z paklitakselem (*Taxol*) rozcieńczano 6-krotnie 0,9% jałowym roztworem chlorku sodu do wstrzykiwań.

Sporządzony koncentrat preparatu placebo *C-E*, zawierający Cremophor EL oraz bezwodny alkohol etylowy w takich samych ilościach jak w preparacie oryginalnym, wyjaławiano przez sączenie i rozcieńczano 6-krotnie 0,9% roztworem chlorku sodu do wstrzykiwań.

Przygotowanie preparatów, pobranie do strzykawek oraz napełnianie przedłużaczy do pompy strzykawkowej odbywało się w warunkach aseptycznych.

10.2. Przygotowanie zwierząt doświadczalnych

Eksperyment wykonano po uzyskaniu zezwolenia Niezależnej Komisji Etyki Badań Naukowych Akademii Medycznej w Gdańsku.

Doświadczenie wykonano na 35 białych królikach rasy nowozelandzkiej obu płci o masie 2,5 - 3,5 kg. Zwierzęta przebywały w pojedynczych klatkach, w miejscu

przeprowadzania doświadczenia 4 dni przed jego wykonaniem. W pomieszczeniu, w którym przebywały króliki kontrolowano temperaturę (20 °C-25 °C) i wilgotność powietrza (50-60%) oraz zmieniano oświetlenie w cyklu: 10 godzin - dzień, 14 godzin - noc. Króliki karmiono pełnowartościową karmą suchą składającą się z nasion, ziaren i suszonych warzyw. Zwierzęta miały zapewniony nieograniczony dostęp do wody.

10.3. Aplikacja preparatów, obserwacje, pobieranie materiału do badań

Preparaty w ilości 10 ml podawano królikom za pomocą dwustanowiskowej pompy strzykawkowej bądź infuzora w 5-godzinny wlew dożylny z szybkością 2 ml/h przez kaniulę umieszczoną w żyłę brzeżnej ucha.

Królikom podawano 4 preparaty, których skład i przygotowanie opisano w p. 10.1 (*Metodyka*). Preparaty *PTX-WDL*, *Taxol* oraz *WDL* otrzymywało po 10 królików, natomiast placebo *C-E* otrzymywało 5 królików. Króliki obserwowano przez 96 h.

W trakcie wlewu obserwowano zachowanie królików oraz miejsce podawania preparatu. W czasie trwania doświadczenia królikom pobierano krew do badań laboratoryjnych oraz do analizy stężenia paklitakselu w osoczu. Przed każdym pobraniem krwi, królikom mierzono temperaturę ciała w odbycie.

Krew do oznaczenia stężenia leku w osoczu pobierano przed rozpoczęciem wlewu oraz po 4 h i 24 h od jego rozpoczęcia (19 h po zakończeniu wlewu). Krew do analizy biochemicznej pobierano przed rozpoczęciem wlewu, po 4 h, 24 h, 48 h, 72 h i 96 h od jego rozpoczęcia. Badania laboratoryjne wykonano w Centralnym Laboratorium Biochemicznym Akademii Medycznej w Gdańsku. Przeprowadzono badanie morfologii krwi oraz aktywności aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginowej i fosfatazy alkalicznej.

Krew do analizy stężenia leku w osoczu pobierano do probówek zawierających heparynę litową (68 I.U., BD Vacutainer). Krew wirowano (20 min, 2300×g), osocze przenoszono do probówek typu Eppendorf i przechowywano w temp. -30 °C do momentu analizy (maksymalnie 250 dni).

W celu stwierdzenia wpływu preparatu na stan tkanek w obrębie miejsca aplikacji (np. wywołanie martwicy), po uśmierceniu zwierząt, tkanki z okolic miejsca podawania układu pobierano do badania histopatologicznego.

10.4. Badanie histopatologiczne uszu królików

Badanie przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Małżowiny uszne królików umieszczono w 4% roztworze buforowanej formaliny. Z każdej małżowiny usznej wycięto dwa fragmenty do badania histopatologicznego

obejmujące całą grubość małżowiny. Fragmenty pobierano prostopadłe do długiej osi małżowiny z okolicy śladu po wkłuciu. Zgodnie z obowiązującą procedurą histologiczną zabezpieczony materiał przeprowadzono przez szeregi ksylenu i alkoholu, następnie zatopiono w parafinie. Z blozków parafinowych na mikrotomie cięto skrawki, które barwiono hematoksyliną i eozyną. Tak uzyskane preparaty histologiczne badano w mikroskopie świetlnym.

10.5.Oznaczenie stężenia paklitakselu w osoczu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Stężenie paklitakselu oznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w układzie faz odwróconych.

Do 1000 µl osocza dodawano 50 µl metanolowego roztworu wzorca wewnętrznego - diazepamu - o stężeniu 1 µg/ml, 5 ml octanu etylu i wytrząsano 3 min przy użyciu wytrząsarki do probówek typu Vortex. Następnie próby wymrażano, wirowano 20 min (2300×g), ponownie wymrażano, wirowano 20 min (2300×g), oddzielano warstwę organiczną, którą odparowywano w temp. 40 °C w strumieniu powietrza, a pozostałość rozpuszczano w 200 µl metanolu.

Warunki analizy [100]:

- faza ruchoma: acetonitryl/metanol/woda (35:25:40),
- kolumna: Vydac, 250×4,6 mm, z wypełnieniem oktadecylokrzemowym (C18, 5 µm),
- szybkość przepływu: 1,0 ml/min,
- detekcja: 228 nm.

Na kolumnę chromatograficzną наносzono za pomocą pętli dozującej 20 µl badanego roztworu. Czas retencji paklitakselu wynosił ok. 10 min.

Na podstawie powierzchni piku paklitakselu (A_p) oraz diazepamu (A_D) wyznaczono równanie regresji prostoliniowej. Stężenie paklitakselu - C [ng/ml] obliczano ze wzoru:

$$C = \frac{R + 0,0068}{0,6663}, \text{ gdzie } R = \frac{A_p}{A_D}$$

10.5.1. Walidacja metody

Sporządzono wodno-metanolowe (3:1) roztwory paklitakselu o stężeniach 0,01, 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,4, 1 µg/ml. Do 1000 µl roztworu dodawano 50 µl metanolowego roztworu diazepamu (wzorca wewnętrznego) o stężeniu 1 µg/ml i dalej postępowano zgodnie z opisem przedstawionym powyżej.

Sporządzono także roztwory wzorcowe paklitakselu o stężeniach 0,2, 0,4, 0,8, 2, 4, 8, 20 µg/ml zawierające diazepam (jako wzorzec wewnętrzny) w ilości 1 µg/ml. Do 1000 µl osocza krwi królika dodawano 50 µl metanolewego roztworu paklitakselu z diazepamem i dalej postępowano zgodnie z opisem przedstawionym powyżej.

Stosunek powierzchni piku paklitakselu do diazepamu, powtarzalność metody oraz jej czułość określano na podstawie wyników analiz z 3 niezależnych prób.

11. BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ NA MYSZACH

Badania przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii Akademii Medycznej w Gdańsku.

11.1. Przygotowanie preparatów do badania toksyczności ostrej

Myszom podawano 4 preparaty:

- ✓ *PTX-WDL* - nowy preparat paklitakselu (100 mg/100 ml),
- ✓ *Taxol* - preparat referencyjny - lek oryginalny (100 mg/100 ml),
- ✓ placebo 1 - 0,9% roztwór chlorku sodu do wstrzykiwań,
- ✓ placebo 2 - 5% podstawowa izotoniczna jajowa WDL - nośnik nowego preparatu.

Preparaty przygotowano w taki sam sposób jak dla królików (p. 10.1, *Metodyka*).

11.2. Przygotowanie zwierząt doświadczalnych

Eksperyment wykonano po uzyskaniu zezwolenia Niezależnej Komisji Etyki Badań Naukowych Akademii Medycznej w Gdańsku.

Doświadczenie wykonano na 36 myszach Balb/c, płci męskiej o wadze 20-25 g. Zwierzęta przebywały w miejscu przeprowadzania doświadczenia 4 dni przed jego wykonaniem po 5 sztuk w klatkach. W pomieszczeniu, w którym przebywały myszy kontrolowano temperaturę (20 °C-25 °C) oraz wilgotność powietrza (50-60%). Oświetlenie zmieniano w cyklu: 10 godzin - dzień, 14 godzin - noc. Myszy karmiono granulatem przeznaczonym dla gryzoni. Zwierzęta miały zapewniony nieograniczony dostęp do wody.

11.3. Aplikacja preparatów i obserwacje

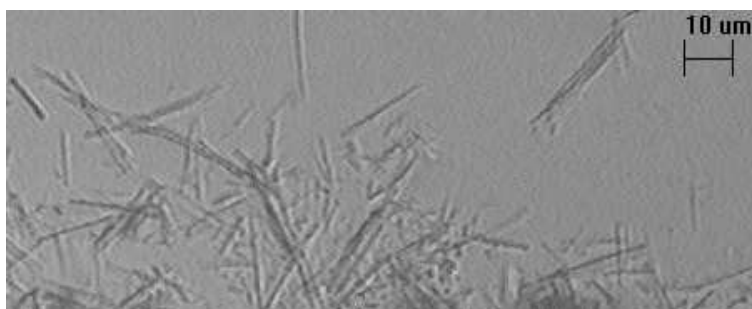
Myszom podawano 4 preparaty. Preparaty *PTX-WDL*, *Taxol* oraz *WDL* (placebo 1) otrzymywało po 10 myszy, natomiast 0,9% roztwór chlorku sodu (placebo 2) otrzymywało 6 myszy. Badane preparaty podawano myszom dootrzewnowo w objętości 300 µl, 3 razy dziennie w odstępach 6-godzinnych (godz. 8.00, 14.00 oraz 20.00) przez kolejnych 6 dni.

Obserwowano zachowanie myszy, ich aktywność ruchową oraz notowano śmiertelność zwierząt po podaniu kolejnej dawki preparatu.

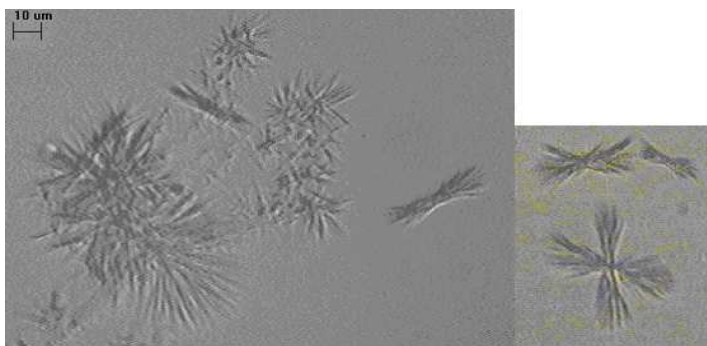
IV. WYNIKI

1. AMORFICZNA FORMA PAKLITAKSELU

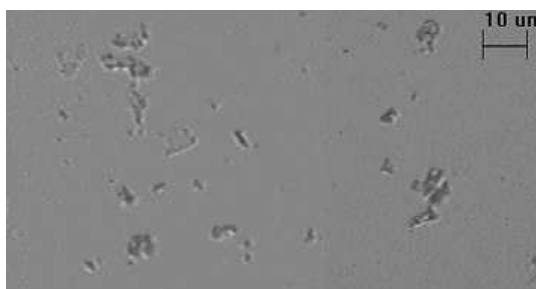
Paklitaksel krystaliczny obserwowany pod mikroskopem optycznym ma postać długich igieł o wielkości do 30 μm (Rycina 9). W trakcie rozcieńczania wodą wodno-organicznego roztworu paklitakselu przeznaczonego do liofilizacji dochodzi do wytrącenia substancji w postaci długich igieł, które układają się w charakterystyczne „gwiazdki” lub „kokardki” (Rycina 10) o wielkości najczęściej od 30 do 60 μm . W układzie występują też nieliczne pojedyncze igły paklitakselu. Obserwowana pod mikroskopem optycznym forma amorficzna substancji zawieszona w wodzie ma postać nieregularnych cząstek (Rycina 11), znacznie mniejszych od formy krystalicznej - większość cząstek mieści się w zakresie od 3 do 5 μm .



Rycina 9. Zawiesina paklitakselu krystalicznego w wodzie.



Rycina 10. Kryształy paklitakselu, które powstają podczas rozcieńczania wodą roztworu paklitakselu przygotowanego do liofilizacji.



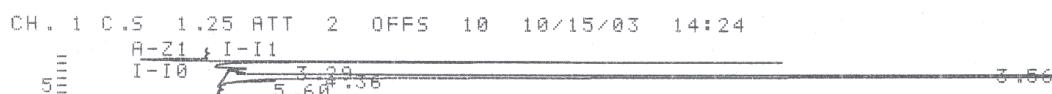
Rycina 11. Zawiesina paklitakselu amorficznego w wodzie.

2. ROZPUSZCZALNOŚĆ PAKLITAKSELU W WODNYCH DYSERSJACH LECYTyny I W UKŁADACH Z DODATKIEM INNYCH SUBSTANCJI

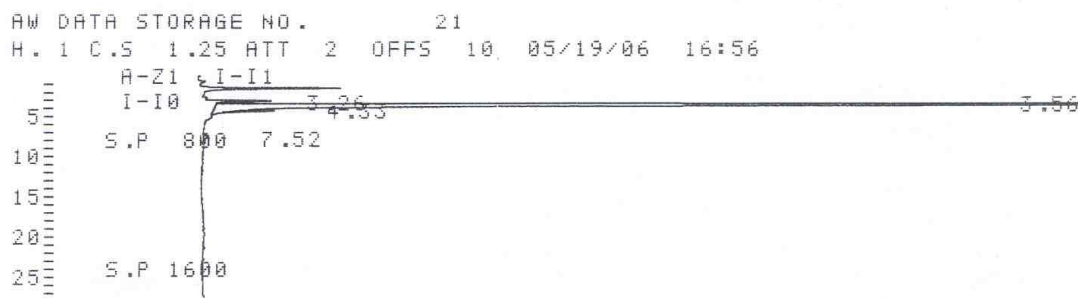
Badano rozpuszczalność paklitakselu w obecności wyłącznie lecytyny lub lecytyny z dodatkiem deoksycholanu sodu, poloksameru, makrogolu, Spanu, chlorku benzalkoniowego, polisorbatu 80 oraz 10% i 20% emulsji dożylniej. Stosowano paklitaksel krystaliczny, amorficzny, a także współliofilizowany z surfaktantami.

Rozpuszczalność badano dodając do rozpuszczalników substancję w nadmiarze, tak aby uzyskać roztwory nasycone. Stężenie rozpuszczonej substancji oznaczano po oddzieleniu substancji nierozpuszczonej metodą wirowania. Analizy ilościowej dokonano stosując metodę HPLC (*Metodyka*, p. 8). *Rycina 12* przedstawia uzyskane przykładowe chromatogramy roztworów wzorcowych paklitakselu (w metanolu i w fazie ruchomej z dodatkiem WDL) oraz chromatogram 3% jajowej WDL rozcieńczonej fazą ruchomą.

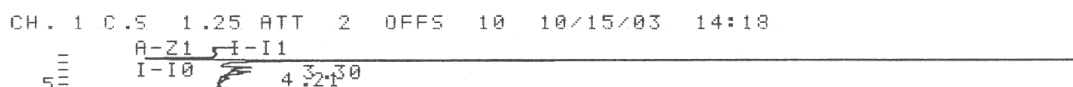
a)



b)



c)



Rycina 12. Chromatogramy roztworów:

- a) paklitakselu w fazie ruchomej (10^{-5} g/ml) z dodatkiem lecytyny jajowej
- b) paklitakselu w metanolu (10^{-5} g/ml)
- c) WDL w fazie ruchomej.

Czas retencji paklitakselu (t_R) wynosił ok. 3,5 min. Jak wynika z przedstawionych chromatogramów metoda analityczna była specyficzna. Obecność lecytyny nie wpłynęła na wielkość i położenie pików paklitakselu. W wyniku analizy chromatograficznej roztworów wzorcowych otrzymano następujące równanie regresji prostoliniowej:

$$A = 19,11 C + 0,801$$
$$R^2 = 0,9999$$

A - powierzchnia pików paklitakselu [tys.]
C - stężenie paklitakselu [$\mu\text{g/ml}$]

Powtarzalność metody („między dniami”), wyrażona względnym odchyleniem standardowym, wynosiła 2,63%.

Rozpuszczalności paklitakselu badano w czasie 24 h w temperaturze pokojowej (*Metodyka*, p. 7.1-7.3). Warunki te wynikały z faktu, że w praktyce klinicznej pacjenci otrzymują wlew z paklitakselem w czasie 3 h lub 24 h (*Wstęp*, str. 18). Układy dodatkowo wytrząsano, a w tych warunkach może dojść do szybszego wytrącania substancji leczniczej niż w trakcie powolnego, ciągłego wlewu dożylnego.

W *Tabelach 14-21* przedstawiono uzyskane wyniki badania rozpuszczalności jako wartości średnie najczęściej z 2 badań. Różnice w rozpuszczalności nie przekraczały zazwyczaj 15%. Dla łatwiejszego rozróżniania poszczególnych układów każdemu nadano odpowiedni symbol. Lecytynę jajową i sojową oznaczono odpowiednio jako **e** i **s**. Jeśli zastosowano współliofilizację lub liofilizację nośnika, na początku symbolu układu widnieje litera **L**. Substancje pomocnicze oznaczono jako: **d** - deoksycholan sodu, **p** - poloksamer F68, **m** - PEG 6000, **b** - chlorek benzalkoniowy, **S** - Span 80. Paklitaksel oznaczono literą **P** i symbol ten widnieje tylko w układach współliofilizowanych. Układy o takim samym składzie jakościowym substancji pomocniczych oznaczano dodatkowo numeracją.

Tabela 14 przedstawia wyniki badania rozpuszczalności amorficznej i krystalicznej formy paklitakselu (*Metodyka*, p. 7.1) w dyspersjach lecytyny jajowej oraz sojowej otrzymywanych metodą opisaną w p. 3 (*Metodyka*, *Tabela 12*).

Tabela 14. Rozpuszczalność amorficznego i krystalicznego paklitakselu w wodnych dyspersjach lecytyny oraz rozpuszczalność w wodzie paklitakselu współliofilizowanego z lecytyną

RODZAJ LECYTYNY	STĘŻENIE LECYTYNY [%]	SYMBOL UKŁADU	ROZPUSZCZALNOŚĆ [mg/100 ml]		
			0 h	6 h	24 h
JAJOWA	PAKLITAKSEL KRYSTALICZNY				
	3	e3''	6,2	20,2	28,9
	5	e3	n.b.	19,3	38,1
	10	e6	n.b.	19,4	45,5
	PAKLITAKSEL AMORFICZNY				
	1	e3'	133,2	104,6	11,3
	3	e3'' *	90,1	92,2	90,2
	3,3	Le	n.b.	13,5	12,4
	5	e3**	296,6	295,2	103,3
	5	e4	511,5	583,6	475,4
	PAKLITAKSEL WSPÓŁLIOFILIZOWANY				
	1	LeP1	16,9	16,5	18,8
	3,3	LeP2	23,2	21,0	25,5
	3,3	LeP3	51,7	51,1	54,6
	3,3	LeP4	57,8	58,8	29,9
SOJOWA	PAKLITAKSEL AMORFICZNY				
	1	s3'	211,0	182,3	155,5
	5	s3**	299,8	292,7	233,2
	5	s4	579,8	565,7	103,5
	PAKLITAKSEL WSPÓŁLIOFILIZOWANY				
	3	Ls	7,1	7,4	14,0

n.b. - nie badano

* - całkowite stężenie paklitakselu wynosiło 100 mg/100 ml

** - całkowite stężenie paklitakselu wynosiło 300 mg/100 ml

Rozpuszczalność paklitakselu krystalicznego w WDL jest bardzo mała (Tabela 14) i substancja rozpuszcza się powoli. Po 24 h, w zależności od stężenia lecytyny jajowej, uzyskano rozpuszczalność tylko 29-45 mg/100 ml.

W przeciwieństwie do paklitakselu krystalicznego, amorficzna forma substancji rozpuszcza się szybko i po 2-5 min wytrząsania układu (t=0) uzyskano rozpuszczalność leku w 1% jajowej WDL 133 mg/100 ml, a w 5% sojowej oraz jajowej WDL - 580 mg/100 ml. Najniższy wynik, tzn. 90 mg/100 ml w 3% WDL oraz wyniki uzyskane w s3 i e3 w czasie t=0 nie odpowiadają zapewne rzeczywistej rozpuszczalności, ponieważ wyjątkowo w tych układach całkowita ilość dodanej substancji wynosiła tylko 100 mg/100 ml lub 300 mg/100 ml, a więc najprawdopodobniej uległ rozpuszczeniu cały dodany paklitaksel. Badań tych nie powtórzono z większym nadmiarem paklitakselu

z powodu niedostatecznej dostępności substancji do badań i decyzji o dalszych eksperymentach z udziałem 5% WDL.

W czasie 24 h nastąpił spadek stężenia substancji rozpuszczonej we wszystkich układach sporządzonych z udziałem amorficznego paklitakselu. 5% WDL zawierające lecytynę jajową i sojową wykazywały podobne zdolności solubilizacyjne wobec amorficznego paklitakselu, jednak w trakcie 24 h większą stabilność uzyskano w jajowej WDL (**e4**). W tym przypadku po 24 h zaobserwowano tylko niewielki spadek rozpuszczalności do ok. 500 mg/100 ml (*Tabela 14 i 15*), natomiast w sojowej WDL (**s4**) do 103-233 mg/100 ml. Mimo to można stwierdzić, że stosując więc amorficzny paklitaksel udało się uzyskać w 5% jajowej lub sojowej WDL rozpuszczalność powyżej 100 mg/100 ml przez co najmniej 24 h. Również w 1% WDL uzyskano rozpuszczalność paklitakselu powyżej 100 mg/100 ml, ale w przypadku jajowej WDL (**e3'**) stężenie rozpuszczonej substancji uległo obniżeniu po 24 h do 11 mg/100 ml. Był to więc układ niestabilny fizycznie. W układach, w których doszło do spadku stężenia substancji rozpuszczonej zaobserwowano pod mikroskopem cząstki paklitakselu w formie długich igieł.

Nie przeprowadzono dokładnych badań nad wpływem homogenizacji wysokociśnieniowej na właściwości solubilizacyjne WDL. Trudno jest bezpośrednio porównać rozpuszczalność w czasie $t=0$ w układach **e3** i **e4**, gdyż, jak wcześniej wskazano, w układzie **e3** rozpuszczeniu uległ cały dodany paklitaksel. Otrzymano odmienne wyniki w odniesieniu do jajowej i sojowej WDL, gdy układy obserwowano po 24 h. Po 24 h wyższe stężenie rozpuszczonego paklitakselu obserwowano w homogenizowanej dyspersji lecytyny jajowej (**e4**) niż w jajowej WDL niehomogenizowanej (**e3**). Natomiast w przypadku sojowych WDL, większą rozpuszczalność po 24 h odnotowano w układzie niehomogenizowanym (**s3** vs **s4**).

Podjęto próbę uzyskania dyspersji WDL przechowywanej w postaci liofilizatu i odtworzonej *ex tempore* (*Metodyka*, p. 7.1.2). Taki sposób przechowywania dyspersji mógłby ograniczyć zachodzące w układzie niekorzystne procesy i zwiększyć jej trwałość. Niestety, w 3,3% WDL poddanej liofilizacji (**Le**) uzyskana rozpuszczalność amorficznego paklitakselu wynosiła tylko 13,5 mg/100 ml.

Tabela 15 przedstawia rozpuszczalność paklitakselu w dyspersjach lecytyny jajowej 5% (**e4**) sporządzonych z użyciem lecytyny pochodzącej z trzech różnych serii produkcyjnych. Porównano też rozpuszczalność substancji w dyspersji sporządzonej z lecytyny tej samej serii (seria I), ale w innym terminie. Nie zaobserwowano różnic w początkowej rozpuszczalności paklitakselu w otrzymanych dyspersjach. Dopiero po 24 h w dyspersji lecytyny z serii II odnotowano znaczący spadek stężenia rozpuszczonego paklitakselu.

Tabela 15. Rozpuszczalność paklitakselu amorficznego [mg/100ml] w 5% dyspersjach (e4) sporządzonych z lecytyny jajowej z trzech serii produkcyjnych

SERIA \ CZAS	0 h	24 h
I	579,6	504,2
I	511,5	475,4
II	572,8	387,4
III	572,6	553,9

Oceniono również wpływ czasu przechowywania dyspersji poddanych homogenizacji wysokociśnieniowej (5% WDL, e4) na ich zdolności solubilizacyjne. Wyniki badania rozpuszczalności przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Wpływ czasu przechowywania układu e4 (5% WDL) na właściwości solubilizacyjne dyspersji

CZAS [miesiące]	ROZPUSZCZALNOŚĆ [mg/100 ml]		
	0 h	6 h	24 h
	LECYTyna JAJOWA		
0-1	511,5	583,6	475,4
6	260,5	97,8	61,5
18	117,3	69,9	60,3
	LECYTyna SOJOWA		
0-1	579,8	565,7	103,5
6	313,0	121,0	123,6
18	150,4	111,0	114,0

Zarówno w WDL przechowywanych 6 jak i 18 miesięcy rozpuszczeniu uległa znacznie mniejsza ilość substancji niż w WDL użytych w czasie do 1 miesiąca po sporządzeniu. Sojowa WDL charakteryzowała się większą zdolnością solubilizacji paklitakselu, jednak w każdej dyspersji następował spadek stężenia substancji rozpuszczonej już w trakcie 6 h. Mimo tego niekorzystnego zjawiska, w sojowej WDL nawet po 18 miesiącach przechowywania można uzyskać rozpuszczalność paklitakselu powyżej 100 mg/100 ml. W dyspersjach lecytyny jajowej przechowywanych w temperaturze pokojowej przez dłuższy czas rozpuszczalność substancji po 24 h wynosiła tylko 60 mg/100 ml.

Paklitaksel poddano również współfilizacji z dyspersjami lecytyny jajowej i sojowej (Metodyka, p. 6.1) przewidując, iż proces ten może mieć wpływ zarówno na

rozpuszczalność jak i trwałość układów. Uzyskane liofilizaty mogłyby stanowić proszki do przygotowania roztworów *ex tempore*.

Układy poddane współliofilizacji i zawierające lecytynę jajową różniły się stężeniem lecytyny (**LeP1-LeP4**) oraz stężeniem dodanego paklitakselu (**LeP2-LeP4**) (Tabela 13). W odtworzonych po liofilizacji układach nie doszło do całkowitego rozpuszczenia paklitakselu (Tabela 14). Rozpuszczalność paklitakselu była uwarunkowana stosunkiem lecytyny jajowej oraz paklitakselu w układach poddawanych suszeniu. Najlepszą stabilność i najwyższą rozpuszczalność (52 mg/100 ml) uzyskano przy stosunku 500 mg : 15 mg (**LeP3**), ale rozpuszczeniu uległo tylko 50% paklitakselu zawartego w układzie. Dyspersja **LeP4** (500 mg : 30 mg) charakteryzowała się mniejszą trwałością fizyczną w porównaniu z dyspersją **LeP3**, co wskazuje, że stopień przesycenia układu wpływa na jego trwałość fizyczną. Współliofilizacja paklitakselu z lecytyną sojową nie przyniosła spodziewanego wzrostu rozpuszczalności leku. Uzyskane stężenie rozpuszczonego paklitakselu wynosiło tylko 7 mg/100 ml i wzrosło 2-krotnie w ciągu 24 h (Tabela 14).

W celu stwierdzenia wpływu wytrząsania na trwałość roztworów sporządzonych przez rozpuszczenie amorficznego paklitakselu w izotonicznej 5% jajowej WDL, niektóre układy w trakcie 24 h obserwacji poddano wytrząsaniu, a część pozostawiono bez mieszania. Wyniki porównawcze przedstawia Tabela 17. W przypadku dyspersji lecytyny jajowej zaobserwowano niewielki spadek stężenia rozpuszczonego paklitakselu, gdy układ wytrząsano. Spadek stężenia rozpuszczonego leku w dyspersji lecytyny sojowej wytrząsanej lub niewytrząsanej był znaczny i podobny w obu przypadkach.

Tabela 17. Wpływ wytrząsania na rozpuszczalność paklitakselu amorficznego w 5% dyspersjach lecytyny

ROZPUSZCZALNOŚĆ [mg/100 ml]		
	0 h	24 h
LECYTYNA JAJOWA		
UKŁAD WYTRZĄSANY	511,5	475,4
UKŁAD NIEWYTRZĄSANY	502,4	537,4
LECYTYNA SOJOWA		
UKŁAD WYTRZĄSANY	579,8	103,5
UKŁAD NIEWYTRZĄSANY	528,1	108,5

Kolejne badania przeprowadzono z zastosowaniem układów zawierających obok lecytyny dodatkowe surfaktanty.

Mieszane micle otrzymywano przez rozpuszczenie lecytyny jajowej w obecności jej solubilizatora - deoksycholanu sodu. Układ poddawano także liofilizacji i następnie

odtworzano w wodzie. Przygotowanie tych nośników opisano w p. 4 oraz 6.1 (*Metodyka*). *Tabela 13* podaje składy otrzymanych układów po liofilizacji. Do liofilizatów dodawano *ex tempore* 10 ml lub 15 ml rozpuszczalnika i uzyskiwano układy o stężeniach substancji pomocniczych podanych w *Tabeli 18*.

Wyniki przedstawione w *Tabeli 18* wskazują, że rozpuszczanie krystalicznego paklitakselu w liofilizowanych lub niepoddanych liofilizacji układach zawierających mieszane micelle oraz rozpuszczanie amorficznego paklitakselu w liofilizowanym nośniku nie prowadziło do otrzymania oczekiwanej zwiększonej rozpuszczalności. Mimo zastosowania różnych stężeń lecytyny i deoksyholanu sodu tylko w przypadku użycia amorficznego paklitakselu i liofilizowanego nośnika (**Led3**, 2%-2%) obserwowano rozpuszczalność substancji powyżej 100 mg/100 ml. Niestety również w tym przypadku układ nie był trwały i po 24 h rozpuszczalność wynosiła tylko 17 mg/100 ml.

Tabela 18. Rozpuszczalność amorficznego i krystalicznego paklitakselu w układach zawierających mieszane micelle złożone z lecytyny jajowej oraz deoksyholanu sodu (d) oraz rozpuszczalność paklitakselu współliofilizowanego z micelami mieszanymi (lecytyna jajowa - e, lecytyna sojowa - s)

PAKLITAKSEL	SYMBOL UKŁADU	e/s - d [%] *	ROZPUSZCZALNOŚĆ [mg/100 ml]		
			0 h	6 h	24 h
PAKLITAKSEL KRYSTALICZNY					
NOŚNIK NIELIOFILIZOWANY	ed1	1 - 1	n.b.	14,5	9,8
	ed2	2 - 0,5	n.b.	10,7	8,0
NOŚNIK LIOFILIZOWANY	Led1	1 - 1	n.b.	0,05	0,09
	Led2	2 - 0,5	n.b.	11,5	13,2
PAKLITAKSEL AMORFICZNY					
NOŚNIK LIOFILIZOWANY	Led3	2 - 2	128,8	114,4	17,2
	Led4	3 - 3	n.b.	56,6	55,1
	Led5	3 - 0,75	17,3	18,2	10,4
PAKLITAKSEL WSPÓŁLIOFILIZOWANY					
LECYTYNA JAJOWA	LedP1	0,5 - 0,5	74,9	69,6	31,3
	LedP2	1 - 0,2	101,8	8,4	7,1
	LedP3	1 - 0,5	109,4	87,5	44,9
	LedP4	1 - 0,8	126,4	54,7	61,5
	LedP5	1 - 1,5	115,5	89,3	25,5
	LedP6	1,6 - 1,6	160,5	139,8	28,5
	LedP7	2 - 2	174,8	151,5	24,1
	LedP8	2,5 - 2,5	173,4	151,0	109,8
LECYTYNA SOJOWA	LsdP1	2,5 - 1,25	164,6	163,3	17,9
	LsdP2	2,5 - 2,5	181,2	193,4	186,1

* - stężenie składników po odtworzeniu układów liofilizowanych

n.b. - nie badano

Rozpuszczalność paklitakselu współliofilizowanego z mieszanymi micelami zależała od stosunku lecytyny do deoksycholanu sodu. W czasie $t=0$ tylko układ zawierający lecytynę i deoksycholan w stężeniu 0,5% (**LedP1**) nie zapewnił rozpuszczalności paklitakselu na poziomie 100 mg/100 ml. Najbardziej obiecujący układ zawierał stężenie lecytyny jajowej 2,5% i deoksycholanu sodu również 2,5% (**LedP8**). Uzyskana w nim rozpuszczalność paklitakselu wynosiła 173 mg/100 ml. Podobną rozpuszczalność uzyskano w układzie zawierającym mniejsze stężenia substancji pomocniczych, tzn. 2% (**LedP7**), jednak okazało się, że wyższe stężenia lecytyny i deoksycholanu sodu są niezbędne, aby rozpuszczalność po 24 h była odpowiednio wysoka. Układ **LedP8** pozwolił na utrzymanie stężenia rozpuszczonego paklitakselu na poziomie co najmniej 110 mg/100 ml przez 24 h, natomiast oznaczone po 24 h stężenie rozpuszczonego paklitakselu w układzie **LedP7** wynosiło tylko 24 mg/100 ml.

Najlepsze właściwości solubilizacyjne wśród mieszanych miceli posiadał, analogiczny do **LedP8**, układ otrzymany przez współliofilizację paklitakselu z lecytyną sojową i deoksycholanem sodu (**LsdP2**). W tym przypadku uzyskano też największą trwałość fizyczną. Oznaczone po 24 h stężenie rozpuszczonego paklitakselu wynosiło 186 mg/100 ml. Rozpuszczalność paklitakselu w tym układzie była jednak niższa niż w nieliofilizowanych dyspersjach lecytyny jajowej i sojowej (**e4, s4**) (Tabela 14).

W Tabeli 19 przedstawiono wpływ na rozpuszczalność paklitakselu wielokrotnej współliofilizacji z lecytyną jajową i deoksycholanem sodu (Metodyka, p. 6.2). Układy poddane wielokrotnej liofilizacji zawierały paklitaksel w stężeniu 100 mg/100 ml. Stężenie substancji pomocniczych było takie samo jak w układzie **LedP4** (Tabela 18), natomiast ilość paklitakselu - o połowę mniejsza. Kilukrotne suszenie sublimacyjne nie zwiększyło rozpuszczalności paklitakselu. Układy, w których pomiędzy kolejnymi etapami liofilizacji zastosowano wodę jako rozpuszczalnik charakteryzowały się podobną rozpuszczalnością jak układy poddane pojedynczej liofilizacji. W zależności od ilości przeprowadzonych liofilizacji zaobserwowano szybciej lub wolniej postępujący w czasie spadek stężenia rozpuszczonego paklitakselu. Jednak po 24 h obserwowano znaczny spadek stężenia rozpuszczonej substancji we wszystkich układach. Układy, dla których jako rozpuszczalnika pomiędzy liofilizacjami użyto wody z dodatkiem dioksanu charakteryzowały się bardzo małą rozpuszczalnością paklitakselu w zakresie 5,7-7,8 mg/100 ml.

Pod mikroskopem obserwowano igły wytrąconego paklitakselu, gdy jako rozpuszczalnika pomiędzy suszeniami używano wody z 20% dodatkiem dioksanu, natomiast gdy rozpuszczalnikiem była sama woda pod mikroskopem obserwowano tylko kuliste cząstki, co wskazuje, że nie dochodziło do krystalizacji paklitakselu a jedynie do niecałkowitego rozpuszczenia liofilizatu.

Tabela 19. Wpływ wielokrotnej współliofilizacji z mieszanymi micelami na rozpuszczalność paklitakselu [mg/100 ml]

ILOŚĆ LIOFILIZACJI	ROZPUSZCZALNIK LIOFILIZATU					
	WODA			WODA:DIOKSAN (4:1)		
	0 h	6 h	24 h	0 h	6 h	24 h
1	81,5	81,8	23,3	n.b.		
2	93,6	61,0	23,0	7,85	5,31	4,11
3	88,3	87,4	34,4	5,70	4,79	5,46
4	81,6	49,8	30,5	6,11	3,86	2,51

n.b. - nie badano

Paklitaksel poddano także współliofilizacji z lecytiną jajową i innymi substancjami pomocniczymi - chlorkiem benzalkoniowym, poloksamerem F68 lub makrogolem 6000. Wyniki badań rozpuszczalności paklitakselu w tych układach przedstawia *Tabela 20*. Przygotowanie nośników opisano w p. 6.1 (*Metodyka*). *Tabela 13* podaje składy otrzymanych układów po liofilizacji. Do liofilizatów dodawano *ex tempore* 10 ml rozpuszczalnika (*Metodyka*, p. 7.2) i uzyskiwano końcowe stężenia substancji pomocniczych podane w *Tabeli 20*.

Tabela 20. Rozpuszczalność współliofilizowanego paklitakselu (P) w układach zawierających lecytinę jajową (e) oraz dodatkowy surfaktant (X)

DODATKOWY SURFAKTANT	SYMBOL UKŁADU	P - e - X [%]	ROZPUSZCZALNOŚĆ [mg/100 ml]		
			0 h	6 h	24 h
POLOKSAMER	<i>LepP1</i>	0,1 - 3,3 - 0,66	49,6	54,3	51,9
	<i>LepP2</i>	0,1 - 3,3 - 0,16	42,0	43,9	50,7
PEG 6000	<i>LemP</i>	0,1 - 3,3 - 1,0	22,3	23,5	17,3
CHLOREK BENZALKONIOWY	<i>LebP</i>	0,1 - 3, - 0,01	12,4	8,4	5,4

p - poloksamer F68, m - PEG 6000, b - chlorek benzalkoniowy

Rozpuszczalność paklitakselu w tych układach była mała i nie przekraczała 54 mg/100 ml. Najmniejszą rozpuszczalność obserwowano w układzie zawierającym chlorek benzalkoniowy. Dodatek makrogołu nie zwiększył rozpuszczalności leku w porównaniu z układem niezawierającym makrogołu (*Tabela 14*, **LeP3**). Roztwór zawierający poloksamer, związek stosowany jako stabilizator układów dyspersyjnych, cechował się większą stabilnością fizyczną - nie obserwowano zmiany rozpuszczalności w czasie 24 h.

Standardowym rozpuszczalnikiem używanym dla wszystkich układów była woda. W dalszym etapie badań podjęto próbę modyfikacji składu rozpuszczalnika w celu zwiększenia rozpuszczalności paklitakselu i trwałości układów.

Tabela 21 przedstawia rozpuszczalność paklitakselu w zależności od rozpuszczalnika stosowanego do odtwarzania układów liofilizowanych.

Tabela 21. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na rozpuszczalność paklitakselu amorficznego lub współliofilizowanego z substancjami pomocniczymi

LECITYNA	SURFAKTANT	STĘŻENIE [%] *	SYMBOL	ROZPUSZCZALNOŚĆ [mg/ml]					
				CZAS	rozpuszczalnik liofilizatu				
					WODA	2,25% glicerol	1% poloksamer F68	1,7% Tween 80	10% emulsja **
PAKLITAKSEL AMORFICZNY									
e	-	3	Le	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
				6 h	13,5		27,6	38,9	
				24 h	12,4		32,3	36,0	
e	d	3 - 3	Led4	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
				6 h	56,6		61,7	57,6	
				24 h	55,1		53,2	29,5	
e	d	3 - 0,75	Led5	0	16,5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
				6 h	18,6		26,2	41,7	
				24 h	10,4		16,7	20,4	
e	S	3 - 0,75	LeS	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
				6 h	17,1		25,6	37,9	
				24 h	14,0		27,9	33,8	
PAKLITAKSEL WSPÓŁLIOFILIZOWANY									
s	d	2,5 - 1,25	LsdP1	0	164,6	163,1	n.b.	n.b.	170,5
				6 h	163,3	161,5			154,9
				24 h	17,9	11,6			19,2
s	p	3,3 - 0,66	LspP	0	n.b.	1,6	1,3	n.b.	29,2 (34,6)
				6 h		1,3	1,1		30,4 (36,4)
				24 h		1,2	1,2		36,3 (38,0)
e	p	3,3 - 0,66	LepP1	0	49,6	36,5	28,1	n.b.	42,5
				6 h	54,3	47,3	40,7		45,1
				24 h	51,0	49,4	33,1		48,3

* - stężenie lecytyna-surfaktant w końcowym układzie

** - w nawiasach podano rozpuszczalność w emulsji 20%

e - lecytyna jajowa, s - lecytyna sojowa, d - deoksycholan sodu, p - poloksamer F68, S - Span 80

n.b. - nie badano

Dodatek do wody glicerolu w celu uzyskania izotonii nie wpłynął na rozpuszczalność paklitakselu współliofilizowanego z lecytyną i deoksycholanem sodu lub poloksamerem. Zastosowanie 1% roztworu poloksameru lub 1,7% roztworu polisorbatu jako rozpuszczalnika dla liofilizatów zwiększyło rozpuszczalność substancji w układach zawierających lecytynę jajową (**Le**) oraz lecytynę jajową i Span 80 (**LeS**). Uzyskane stężenia wynosiły jednak nie więcej niż 39 mg/100 ml. Bardzo mała rozpuszczalność amorficznego paklitakselu w układzie **Le** (3,3% WDL) wynikała z faktu, iż dyspersja została poddana liofilizacji i odtworzona *ex tempore* przed badaniem rozpuszczalności (Tabela 14 i 21).

Ani roztwory poloksameru ani polisorbatu użyte jako rozpuszczalniki nie zwiększyły rozpuszczalności paklitakselu do 100 mg/100 ml w układach zawierających mieszane micelle lub współliofilizowanych z lecytyną i poloksamerem (**LedP4**, **LedP5**, **LspP**, **LepP1**). Zastosowanie emulsji do żywienia pozajelitowego również nie prowadziło do oczekiwanego zwiększenia rozpuszczalności leku w układzie współliofilizowanym zawierającym mieszane micelle (**LsdP1**). Gdy zastosowano jako rozpuszczalnik wodę, uzyskano stężenie rozpuszczonego paklitakselu 164 mg/100 ml, natomiast przy zastosowaniu 10% emulsji - 170 mg/100 ml. W obu przypadkach po 24 h dochodziło do znacznego obniżenia stężenia rozpuszczonego leku (poniżej 20 mg/100 ml). Zaobserwowano jednak znaczny wzrost rozpuszczalności paklitakselu w układach współliofilizowanych z lecytyną sojową i poloksamerem (**LspP**), a następnie rozpuszczonych w 10% emulsji dożylniej. Nadal jednak rozpuszczalność była mała (29-38 mg/100 ml). Spodziewano się, że dwukrotne zwiększenie stężenia fazy olejowej w wyniku zastosowania emulsji 20% znacząco wpłynie na rozpuszczalność paklitakselu. Okazało się, że zastosowanie emulsji o wyższym stężeniu spowodowało tylko nieznaczny wzrost rozpuszczalności paklitakselu bezpośrednio po rozpuszczeniu (**LspP**) (t=0). Natomiast po upływie 24 h rozpuszczalność paklitakselu w układzie sporządzonym z emulsją 10% była zbliżona do rozpuszczalności leku w emulsji 20% (odpowiednio 35 mg/100 ml i 38 mg/100 ml).

3. CHARAKTERYSTYKA WODNYCH DYSPEKSJI LECYTINY

W celu bliższej charakterystyki wodnych dyspersji lecytyny przeprowadzono pomiar pH, absorbancji, wielkości cząstek, dokonano obserwacji wizualnych oraz mikroskopowych. Przeprowadzono również analizę za pomocą ESR.

Badania wykonano zgodnie z opisem przedstawionym w p. 9 (*Metodyka*). Sporządzenie dyspersji opisano w p. 3 (*Metodyka*).

Do badań wytypowano dyspersje zawierające 5% lecytyny. Poszczególne układy różniły się metodą sporządzenia lub obecnością substancji dodatkowych - glicerolu bądź

buforu fosforanowego. Badano wpływ procesu wyjaławiania oraz homogenizacji na właściwości fizykochemiczne WDL. Układy przechowywano przez okres 72 h w temp. 37 °C, a także 6 lub 18 miesięcy w temperaturze pokojowej. Właściwości wodnych dyspersji lecytyny jajowej i sojowej porównywano z dyspersjami oczyszczonej fosfatydylocholiny. Oceniono także powtarzalność technologii sporządzania WDL, porównując uzyskane parametry dla dyspersji wykonanych z lecytyny 3 serii producenta.

Wszystkie WDL otrzymane po sporządzeniu były homogenne, jednorodne i bez osadów. Jednorodnością i homogennością odznaczały się także wodne dyspersje oczyszczonej fosfatydylocholiny.

Tabele 22-25 przedstawiają wyniki pomiaru pH, absorbancji oraz wielkości cząstek ($d_{(0,5)}$, $d_{(0,9)}$ i $d_{(max)}$) uzyskane dla wszystkich dyspersji sporządzonych z lecytiną jajową i sojową oraz fosfatydylocholimą. Symbole układów zawarte w Tabelach 22-25 zostały wyjaśnione w p. 3 (Metodyka). Poszczególne preparaty różnią się sposobem sporządzenia dyspersji lub obecnością w składzie dodatkowych substancji (Tabela 12).

Tabela 22. Właściwości 5% WDL zawierających lecytinę jajową

układ		e3				e5	e4		
czas		24 h*	24 h	72 h	6 m-cy	6 m-cy	24 h	6 m-cy	18 m-cy
właściwość									
barwa		kremowo-żółta	kremowożółta		ciemno-żółta	kremowo-beżowa	kremowo-żółta	ciemnożółta	
pH		6,67	5,84	5,40	5,54	7,15	5,10	4,53	3,95
klarowność, A		0,158	0,179	0,143	0,266	0,522	0,053	0,064	0,106
wielkość cząstek [µm]	d(0,5)	0,52	0,66	0,59	3,24	1,57	0,46	9,56	12,77
	d(0,9)	1,21	7,23	2,07	19,45	2,88	40,37	54,88	59,47
	dmax	3,49	22,84	18,54	64,92	4,30	52,68	64,92	64,92

* - układ niewyjaławiony

A - absorbancja rozcieńczonego układu przy $\lambda=540$ nm (Metodyka, p. 9.4)

Tabela 23. Właściwości 5% WDL zawierających lecytynę sojową

układ ➡		s3				s5	s4		
właściwość	czas	24 h*	24 h	72 h	6 m-cy	6 m-cy	24 h	6 m-cy	18 m-cy
	barwa	kremowo- żółta	jasnokremowa		mleczna	kremowo- beżowa	jasnokremowa		mleczna
	pH	6,47	5,90	5,83	5,90	7,31	5,48	5,86	5,95
	klarowność, A	0,128	0,119	0,047	0,221	0,598	0,041	0,030	0,077
wielkość cząstek [μm]	d(0,5)	1,70	2,78	3,01	4,02	2,20	1,17	18,38	4,01
	d(0,9)	3,82	5,98	6,98	64,67	3,93	43,14	38,01	8,78
	dmax	8,04	9,91	34,69	64,92	42,75	52,68	52,68	15,04

* - układ niewyjałowiony

A - absorbancja rozcieńczonego układu przy $\lambda=540$ nm (Metodyka, p. 9.4)

Tabela 24 przedstawia zestawienie wyników badania dyspersji lecytyny jajowej wykonanych z substancji pochodzącej z trzech serii producenta.

W Tabeli 25 przedstawiono wyniki uzyskane dla dyspersji zawierającej oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową.

Tabela 24. Porównanie właściwości 5% WDL (po 24 h od wyjałowienia) zawierających lecytynę jajową pochodzącą z trzech różnych serii producenta

		SERIA		
		I	II	III
barwa		kremowożółta		
pH		5,58	5,84	5,14
klarowność, A		0,133	0,179	0,234
wielkość cząstek [μm]	d(0,5)	0,56	0,66	1,63
	d(0,9)	11,26	7,23	6,05
	dmax	34,69	22,84	34,69

A - absorbancja rozcieńczonego układu przy $\lambda=540$ nm (Metodyka, p. 9.4)

Tabela 25. Właściwości 5% wodnych dyspersji zawierających oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową

układ →		f			
czas		24 h*	24 h	72 h	6 m-cy
właściwość					
barwa		mlecznobiała	mlecznoszarobiała		
pH		5,65	5,03	4,91	5,16
klarowność, A		1,173	1,084	1,074	0,667
wielkość cząstek [μm]	d(0,5)	3,68	2,60	2,86	1,05
	d(0,9)	5,11	4,50	4,74	2,72
	dmax	8,04	6,52	6,52	42,75

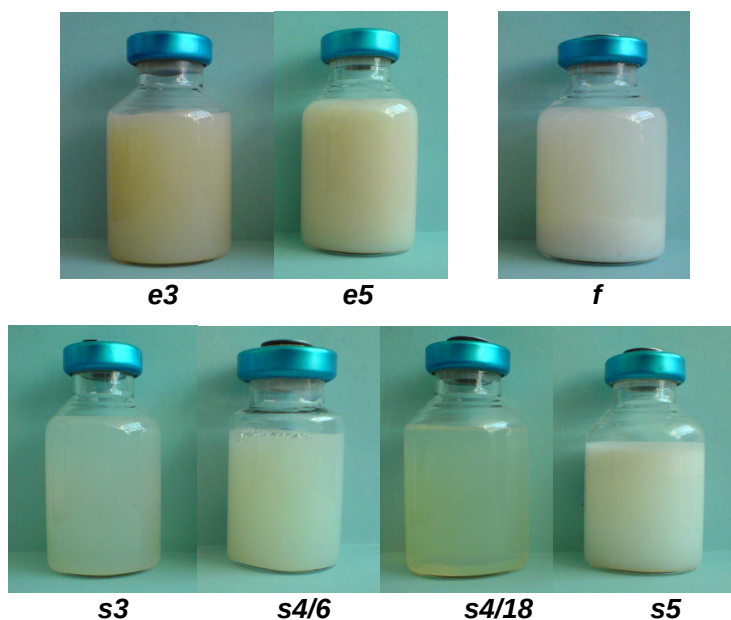
* - układ niewyjaławiony

A - absorbancja rozcieńczonego układu przy $\lambda=540$ nm (Metodyka, p. 9.4)

Uzyskane wyniki przedstawione w Tabelach 22-25 szerzej zaprezentowano poniżej.

Obserwacje wizualne

Barwę badanych dyspersji przedstawiono w Tabelach 22-25. Wygląd niektórych przygotowanych układów obrazuje Rycina 13.



Rycina 13. Dyspersje lecytyny oraz fosfatydylocholiny po 6 (e3, f, s4/6, s5, s3, e5) i 18 (s4/18) miesiącach przechowywania.

Dyspersje lecytyny jajowej (e) charakteryzowały się żółtym zabarwieniem (odcień różnił się nieznacznie w zależności od serii producenta). W trakcie wyjaławiania i przechowywania dyspersje ciemniały, nabierając barwy ciemnożółtej (Tabela 22).

W dyspersjach zawierających bufor fosforanowy (**e5**) w trakcie przechowywania pojawił się flotujący „osad”. Po wstrząśnięciu cząstki ulegały rozproszeniu i WDL ponownie stawała się homogenna. Dyspersje poddane homogenizacji wysokociśnieniowej (**e4**) nie zmieniały zabarwienia podczas wyjaławiania.

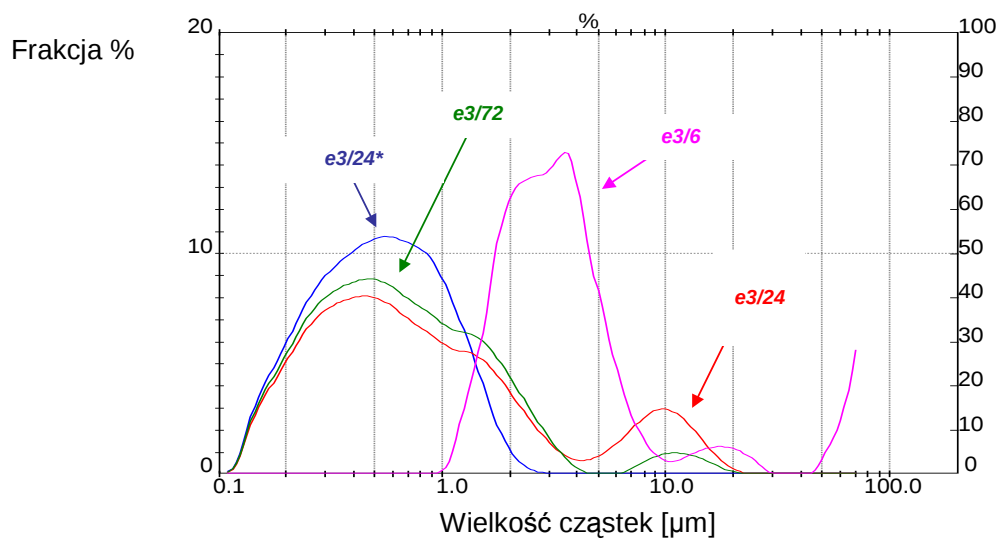
Podstawowe dyspersje zawierające lecytynę sojową (**s3**) charakteryzował mniejszy stopień zmętnienia i mniej intensywne żółte zabarwienie w porównaniu z dyspersjami zawierającymi lecytynę jajową (Tabela 23). Po wyjałowieniu dyspersja traciła żółtawe zabarwienie i stawała się bardziej przejrzysta w porównaniu z układami niewyjałowionymi. W trakcie przechowywania sojowa WDL nabierała intensywnego mlecznego zabarwienia. W ciągu kilku tygodni pojawiło się zmętnienie w całej objętości dyspersji, a w ciągu kilku miesięcy wyraźny osad na dnie fiolki. Po wstrząśnięciu cząstki ulegały rozproszeniu i dyspersja ponownie stawała się homogenna. Dyspersja poddana homogenizacji wysokociśnieniowej stanowiła żółtawy, klarowny roztwór o zwiększonej lepkości. Po ok. 4 miesiącach pojawiało się w niej zmętnienie, które znikало po wstrząśnięciu. Trwałe zmętnienie, a następnie osad powstały po ok. 12 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej.

Dyspersja zawierająca fosfatydylocholinę jajową (**f**) była mleczna, a w trakcie wyjaławiania lekko ciemniała. W wyniku wirowania powstawał osad w ilości 1/3 odwirowanej objętości. Osad nie powstawał podczas wirowania przygotowanych w taki sam sposób dyspersji zawierających lecytynę jajową i sojową. Po kilku dniach przechowywania dyspersji (**f**) pojawiał się osad na dnie fiolki, który ulegał rozproszeniu po wstrząśnięciu.

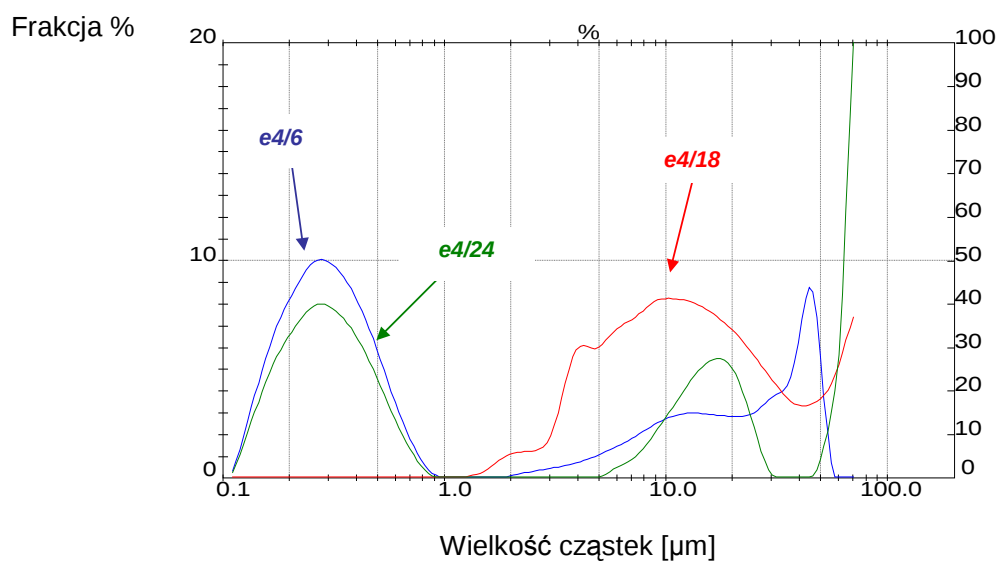
Wielkość cząstek

Wartości parametrów $d_{(0,5)}$, $d_{(0,9)}$ oraz $d_{(max)}$ (Metodyka, p. 9.2) wszystkich badanych układów przedstawiono w Tabelach 22-25. Rozkłady wielkości cząstek przedstawiono na Rycinach 14-20. Pomiar przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w p. 9.2 (Metodyka).

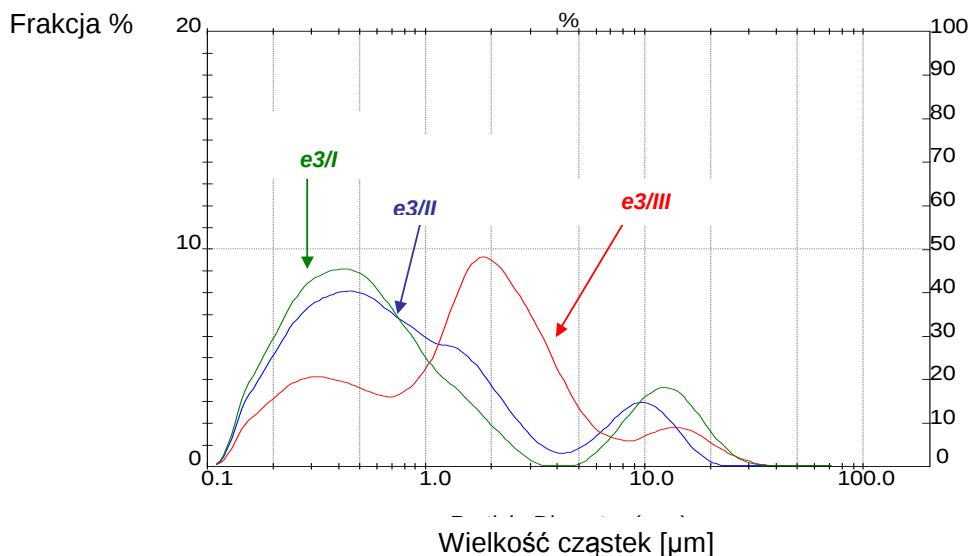
Ryciny 14-16 przedstawiają rozkłady wielkości cząstek w dyspersjach lecytyny jajowej. Chociaż średnia wielkość cząstek po wyjałowieniu zmieniła się niewiele, to zaobserwowano wzrost $d_{(0,9)}$ (**e3**) (Tabela 22). Po 6 miesiącach nastąpił wzrost wartości $d_{(0,5)}$ z 0,66 μm do 3,24 μm . Wzrost wielkości cząstek nastąpił także w dyspersjach poddanych homogenizacji i przechowywanych przez 6 i 18 miesięcy (**e4**). Inny rozkład wielkości cząstek niż w **e4** obserwowano w WDL zawierającej bufor (**e5**) - wszystkie cząstki były mniejsze niż 4,5 μm (Rycina 17, Tabela 22). Zaobserwowano także różnice w rozkładzie wielkości cząstek dyspersji lecytyny jajowej zawierającej lecytynę pochodzącą z różnych serii producenta (**e3**) - chociaż z trzech serii dwie pozwoliły na otrzymanie dyspersji o podobnym rozkładzie wielkości cząstek (Rycina 16, Tabela 24).



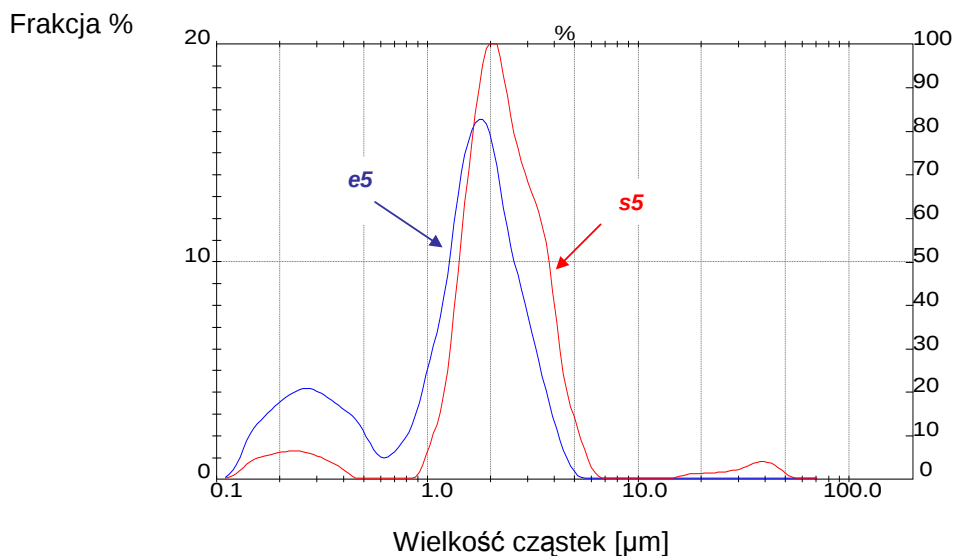
Rycina 14. Rozkład wielkości cząstek dyspersji **e3**
(24* - przed wyjałowieniem, 24 - po wyjałowieniu, 72 - po 72 h w temp. 37 °C,
6 - po 6 miesiącach w temperaturze pokojowej).



Rycina 15. Rozkład wielkości cząstek dyspersji lecytyny jajowej **e4**
po 24 h oraz 6 i 18 miesięcy przechowywania w temperaturze pokojowej.



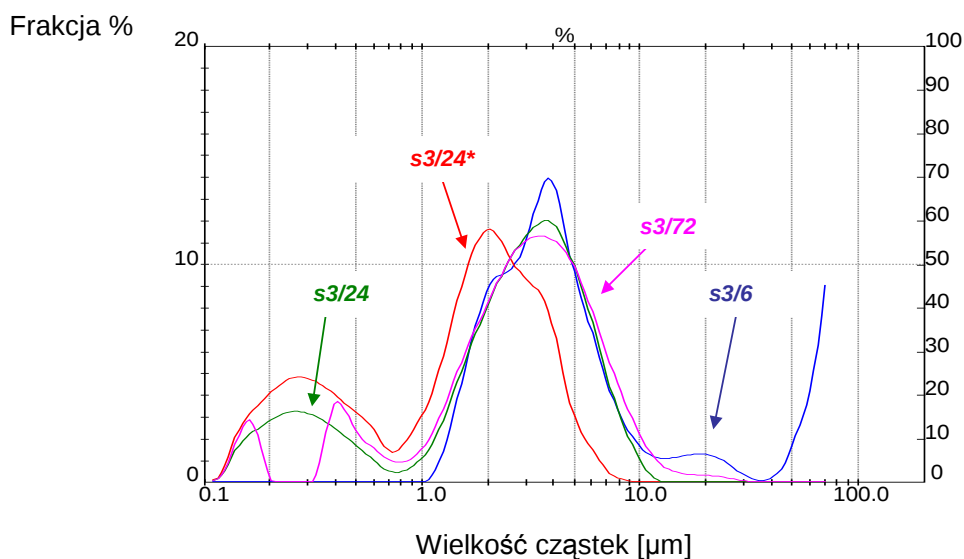
Rycina 16. Rozkład wielkości cząstek dyspersji lecytyny jajowej **e3** wykonanych z lecytyny trzech serii producenta.



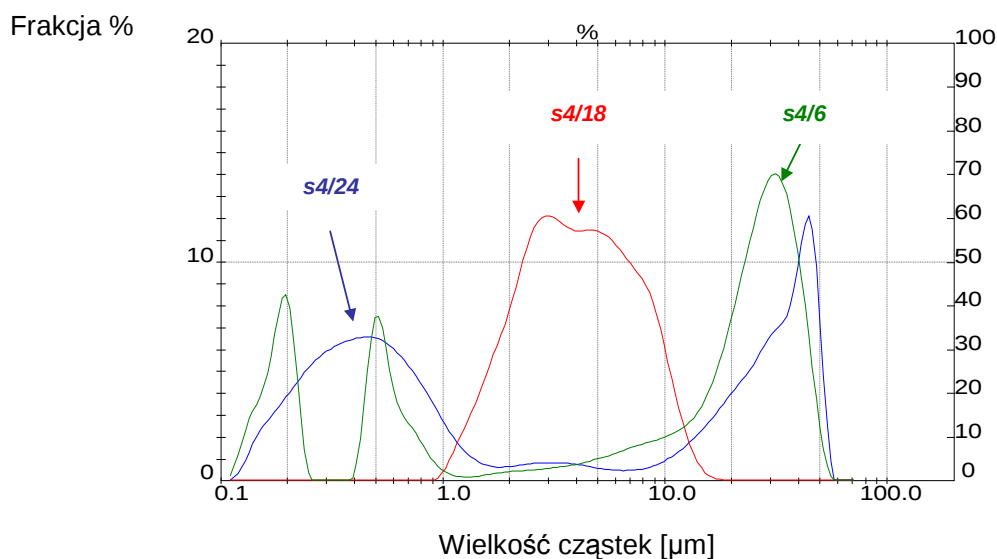
Rycina 17. Rozkład wielkości cząstek buforowanych dyspersji lecytyny jajowej i sojowej (**e5**, **s5**) po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej.

W sojowej WDL średnica cząstek mieści się głównie w zakresie 1-6 μm ($d_{(0,5)}$ 2-3 μm). Wielkość cząstek w dyspersjach zawierających lecytinę sojową (**s3**) tylko w małym stopniu zwiększała się trakcie wyjaławiania. W trakcie przechowywania układów **s3**, **s4** oraz **s5** zanikały cząstki o średnicy mniejszej niż 1 μm . Jak już wcześniej wskazano dyspersje poddane homogenizacji wysokociśnieniowej (**s4**) po 6 miesiącach nadal były klarowne. Badanie za pomocą dyfraktometru laserowego wykazało jednak większe wartości $d_{(0,9)}$ oraz $d_{(\text{max})}$ w dyspersji po 6 miesiącach niż tego samego układu

przechowywanego przez 18 miesięcy (**s4**) (Rycina 18 i 19, Tabela 23). Jak wyraźnie widać na Rycinie 19 wielkość cząstek w sojowej WDL (**s4**) podczas przechowywania różniła się znacząco od innych badanych układów wykazując profil wielomodalny. Tak duże wielkości cząstek (kilkadziesiąt μm) nie mogą jednak obrazować rzeczywistej struktury wewnętrznej układu, który charakteryzował się najwyższą klarownością. Można przypuszczać, że podczas pomiaru (rozcieńczania wodą) dochodziło do wytrącania cząstek.



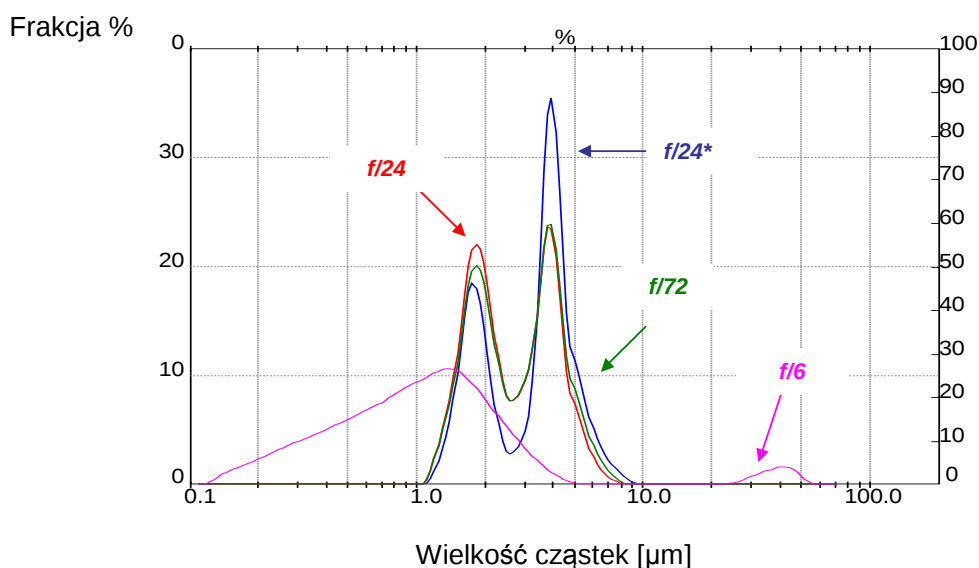
Rycina 18. Rozkład wielkości cząstek dyspersji **s3** (24* - przed wyjałowieniem, 24 - po wyjałowieniu, 72 - po 72 h w temp. 37 °C, 6 - po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej).



Rycina 19. Rozkład wielkości cząstek dyspersji **s4** po 24 h oraz po 6 i 18 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej.

Najkorzystniej na stabilizację układów dyspersyjnych wpłynął dodatek buforu fosforanowego (**e5**, **s5**). Po 6 miesiącach 90% cząstek jajowej WDL (**e5**) miała wielkość poniżej 2,88 μm , natomiast w sojowej WDL - poniżej 3,93 μm (*Rycina 17, Tabela 22 i 23*).

Dyspersje zawierające oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową wykazywały bimodalny rozkład wielkości cząstek, a wszystkie cząstki w układzie po sporządzeniu mieściły się w zakresie 1-10 μm . W porównaniu z dyspersjami zawierającymi lecytynę jajową lub sojową, dyspersje fosfatydylocholiny jajowej (**f**) praktycznie nie wykazywały zmian wielkości cząstek po wyjałowieniu (*Rycina 20, Tabela 25*). Rozkład wielkości cząstek dyspersji przechowywanej przez 6 miesięcy uległ jednak znaczącym zmianom i wyraźnie odróżniał się od pozostałych układów. Bimodalny rozkład zmienił swój charakter na jednomodalny i 90% cząstek miało wielkość w zakresie 0,05-2,7 μm .

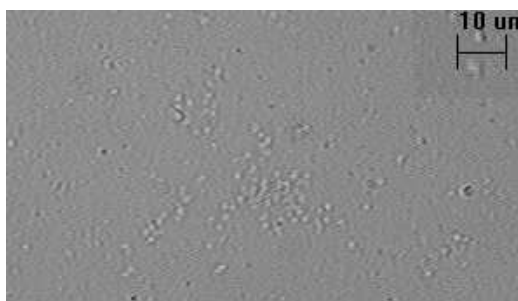


*Rycina 20. Rozkład wielkości cząstek fosfolipidowych w dyspersjach oczyszczonej fosfatydylocholiny jajowej **f** (24* - przed wyjałowieniem, 24 - po wyjałowieniu, 72 - po 72 h w temp. 37 °C, 6 - po 6 miesiącach w temperaturze pokojowej).*

Obserwacje pod mikroskopem

Obraz dyspersji lecytyny jajowej obserwowany pod mikroskopem optycznym przedstawia *Rycina 21*.

Obserwacje pod mikroskopem potwierdziły, że większość cząstek w układzie ma wielkość do 2-3 μm . Nie obserwowano cząstek powyżej 10 μm . Obecność dużych cząstek (kilkadziesiąt μm) stwierdzonych badaniem za pomocą dyfraktometru laserowego może być więc spowodowana tworzeniem agregatów cząstek lecytyny podczas pomiaru.



Rycina 21. Obraz z mikroskopu optycznego, dyspersja lecytyny jajowej (**e3**).

Pomiar absorbancji

Do oceny klarowności oraz tendencji do sedymentacji cząstek w układach wykorzystano pomiar absorbancji dyspersji przygotowanych zgodnie z opisem przedstawionym w p. 9.3 (*Metodyka*) po 50-krotnym rozcieńczeniu. Zmierzoną absorbancję ($\lambda=540$ nm) przedstawiają *Tabele 22-25*.

W układach poddanych wyjaławianiu i przechowywaniu, absorbancja rozcieńczeń dyspersji zawierających lecytynę jajową nie wykazywała znaczących zmian (**e3**). Blisko 2-krotny wzrost absorbancji nastąpił w trakcie 6 miesięcy (**e3**). Najmniejszą absorbancję zaobserwowano dla dyspersji poddanych homogenizacji wysokociśnieniowej (**e4**).

Dyspersje zawierające lecytynę sojową (**s3**) okazały się bardziej klarowne, co potwierdziły obserwacje wizualne i pomiar absorbancji. Absorbancja tych układów malała zarówno podczas wyjaławiania jak i przechowywania przez 72 h, ale wzrosła w dyspersji niehomogenizowanej ponownie po 6 miesiącach podobnie jak w przypadku jajowej WDL. Najmniejszą absorbancję podczas przechowywania wykazywały układy poddane homogenizacji wysokociśnieniowej (**s4**).

Buforowane dyspersje lecytyny jajowej i sojowej (**e5**, **s5**) wykazywały podobną absorbancję, ale znacznie wyższą od pozostałych dyspersji.

Najmniejszą klarownością charakteryzowały się dyspersje zawierające fosfatydylocholinę jajową (**f**), co również potwierdzają obserwacje wizualne i pomiar absorbancji. Parametr ten ulegał tylko nieznacznym zmianom podczas wyjaławiania i przechowywania przez 72 h, lecz wartość absorbancji uległa zmniejszeniu po 6 miesiącach.

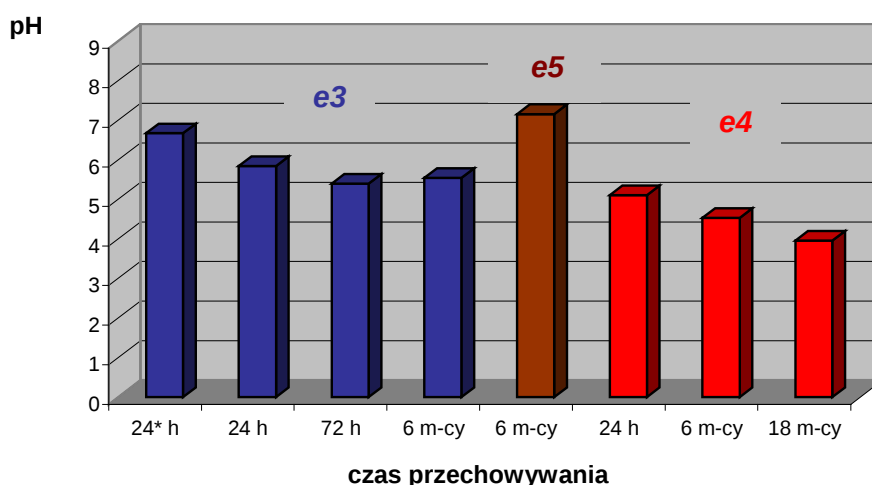
Zmiany odczynu wodnych dyspersji lecytyny

Pomiar wartości pH wykonano zgodnie z opisem przedstawionym w p. 9.1 (*Metodyka*). Zaobserwowano różnice w wartościach pH zarówno w zależności od rodzaju lecytyny, użycia procesu homogenizacji wysokociśnieniowej, obecności buforu

fosforanowego w układzie jak i w zależności od czasu przechowywania układów. Wartości pH wszystkich układów przedstawiają *Tabele 22-25* oraz *Ryciny 22-24*.

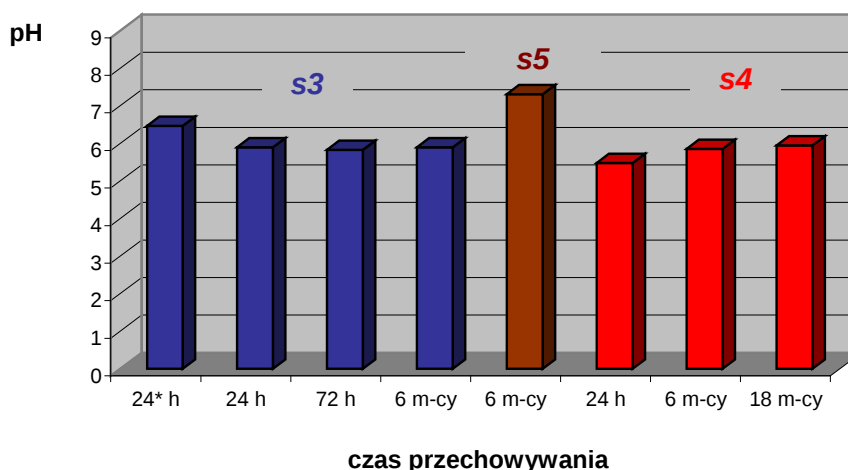
Otrzymane wartości pH stanowiły średnią z trzech niezależnych pomiarów. Wyniki poszczególnych pomiarów nie różniły się o więcej niż 0,1 jednostki pH. W trakcie wyjaławiania dochodziło do obniżenia wartości pH układów, a dalszy jego spadek następował w dyspersjach lecytyny jajowej podczas przechowywania.

Wartości pH niewyjaławionych WDL (sojowych i jajowych) zawierały się w zakresie 6,5-6,7, a po wyjałowieniu w zakresie 5,1-5,9. W trakcie przechowywania jajowej WDL przez 72 h (**e3**) następowało obniżenie wartości pH o 0,44, lecz w dyspersji przechowywanej przez 6 miesięcy nie odnotowano większego spadku pH. Również pH dyspersji zawierającej bufor nie uległo znaczącym zmianom. Wyraże zmiany pH zaobserwowano w układach poddanych homogenizacji wysokociśnieniowej (**e4**). Układy te cechowały się niższym wyjściowym pH od układu niehomogenizowanego (5,10) i wartość ta w ciągu 18 miesięcy spadała do 3,95 (*Rycina 22*).



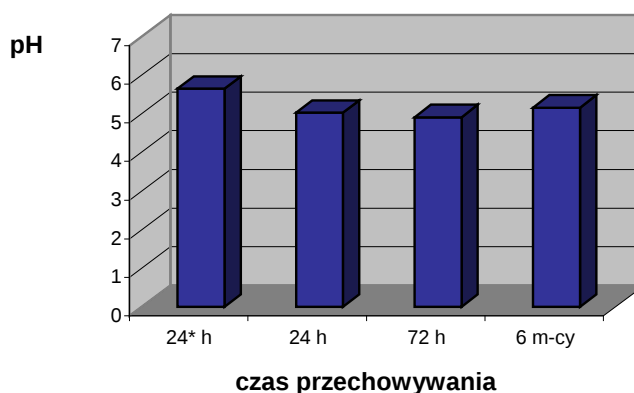
Rycina 22. Wartości pH badanych dyspersji zawierających lecytynę jajową.

Zmiany pH przechowywanych układów zawierających lecytynę sojową przedstawia *Rycina 23* oraz *Tabela 23*. Dyspersje te charakteryzowały się większą stabilnością wartości pH niż dyspersje lecytyny jajowej - po 72 h pH zmniejszyło się o 0,07 jednostki, a w trakcie 6 i 18 miesięcy nie odnotowano większej zmiany pH, również w dyspersjach poddanych homogenizacji wysokociśnieniowej (**s4**).



Rycina 23. Wartości pH badanych dyspersji zawierających lecytynę sojową.

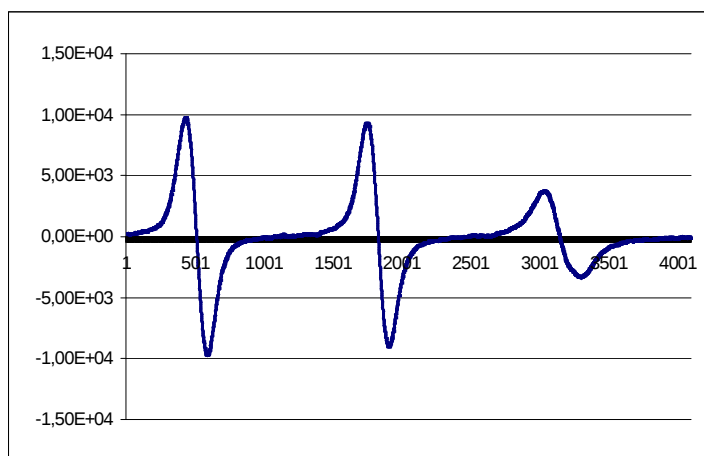
Zmiany pH układów zawierających oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową przedstawia Rycina 24 oraz Tabela 25. W dyspersjach zawierających oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową (**f**) również nie odnotowano dużych zmian wartości pH podczas wyjąławiania i przechowywania. W trakcie wyjąławiania odnotowano spadek pH o 0,62 jednostki, a w trakcie przechowywania nie zaobserwowano dalszych zmian.



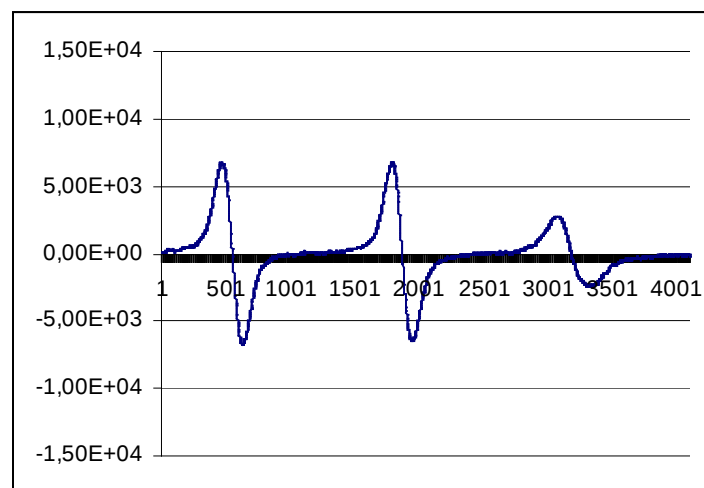
Rycina 24. Wartości pH badanych dyspersji zawierających oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową (**f**).

4. ANALIZA ESR

Analizie ESR (Electron Spin Resonance, *Metodyka*, p. 9.6) poddano układy **e1**, **e3**, **e4**, **e5**, **s1**, **s3**, **s4**, **s5** (Tabela 12), a także dyspersję zawierającą oczyszczoną fosfatydylocholinę jajową (str. 51). Jako znacznika spinowego użyto TEMPOLU. Wszystkie zarejestrowane widma wykazywały podobny przebieg. Przykładowe widma dyspersji lecytyny jajowej i sojowej przedstawiają Ryciny 25 i 26.



Rycina 25. Przykładowe widmo dyspersji lecytyny jajowej **e3**.



Rycina 26. Przykładowe widmo dyspersji lecytyny sojowej **s3**.

Na podstawie uzyskanych widm obliczono czas korelacji rotacyjnej - T_c [ns] oraz polarność środowiska. Badane układy można podzielić na 2 grupy:

- 1) dyspersje lecytyny jajowej oraz dyspersja oczyszczonej fosfatydylocholiny,
- 2) dyspersje lecytyny sojowej.

Wyliczony czas korelacji dla dyspersji z grupy pierwszej wynosił od 468 ns do 581 ns, natomiast polarność wynosiła od 1,042 do 1,030. Czas korelacji rotacyjnej dyspersji lecytyny sojowej wynosił od 392 do 465 ns, a polarność od 1,026 do 1,028. Różnice w czasie korelacji rotacyjnej między dyspersjami lecytyny jajowej i sojowej wskazują na odmienne rozmieszczenie wolnych rodników w układach dyspersyjnych. Im dłuższy czas korelacji rotacyjnej, tym większa lepkość mikrośrodowiska, w którym znajdują się wolne rodniki. Układy o dłuższym T_c charakteryzowały się wyższą polarnością, co może być związane z unieruchomieniem dipola cząsteczki TEMPOLU, ale i ze zmianą uporządkowania warstw fosfolipidowych. Można przypuszczać, że w dyspersjach lecytyny jajowej oraz oczyszczonej fosfatydylocholiny, bez względu na modyfikację techniki

sporządzania i dodatek glicerolu, bądź buforu, powstają podobne struktury fosfolipidowe. Podobnie sytuacja przedstawia się w układach zawierających lecytynę sojową.

5. BADANIA *IN VIVO* NA KRÓLIKACH

35 królikom podawano w 5-godzinny wlew dożylny cztery preparaty: dwa preparaty placebo i dwa zawierające paklitaksel. Przygotowanie i podawanie preparatów, przygotowanie zwierząt oraz pobieranie materiału do badań przebiegało zgodnie z opisem przedstawionym w p. 10 (*Metodyka*).

Obserwacje zwierząt, badania histopatologiczne i biochemiczne

W trakcie podawania preparatów nie zaobserwowano żadnych niepokojących zmian w zachowaniu zwierząt. Temperatura ciała wszystkich zakwalifikowanych do doświadczenia zwierząt mieściła się w zakresie od 38 °C do 40 °C. U 5 samic i u 1 samca w trakcie trwania eksperymentu zanotowano podwyższoną temperaturę ciała (41 °C). Trzy osobniki, u których zanotowano podwyższoną temperaturę ciała otrzymywały *PTX-WDL*, dwa - *WDL*, a jeden - *Taxol*. Maksymalna uznawana za prawidłową temperatura ciała królików wynosi 40 °C [101]. Lekki wzrost temperatury ciała zwierząt mógł być spowodowany podaniem paklitakselu, ale również zaniepokojeniem, jakie króliki mogły odczuwać podczas trwania doświadczenia.

W trakcie badania makroskopowego uszu królików stwierdzono jedynie punktowe ślady po wkłuciach. W badaniu histopatologicznym stwierdzono obrzęk podścieliska łącznotkankowego małżowiny usznej, ponadto ogniskowe, bezodczynowe wylewy krwi, martwicę ścian naczyń oraz odczyn zapalny z limfocytów, eozynofilów i fibroblastów. Ponieważ zmiany te stwierdzono u wszystkich zwierząt biorących udział w badaniu, nie można ich łączyć z działaniem specyficznym leku, ale z uszkodzeniem mechanicznym w trakcie podawania.

Stężenie paklitakselu w osoczu krwi królików

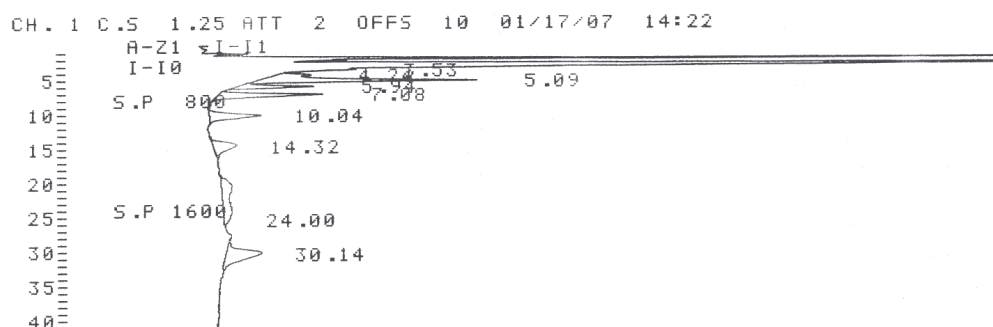
Analizę krwi królików przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w p. 10.5 (*Metodyka*). Na podstawie uzyskanych wyników określano czułość i granicę oznaczalności metody analitycznej, w której zastosowano etap ekstrakcji paklitakselu. Porównano wyniki po ekstrakcji paklitakselu z wody oraz osocza krwi królika (*Tabela 26*). Uzyskane przykładowe chromatogramy przedstawia *Rycina 27*.

Tabela 26. Parametry metody analitycznej stosowanej do oznaczania stężenia paklitakselu w osoczu

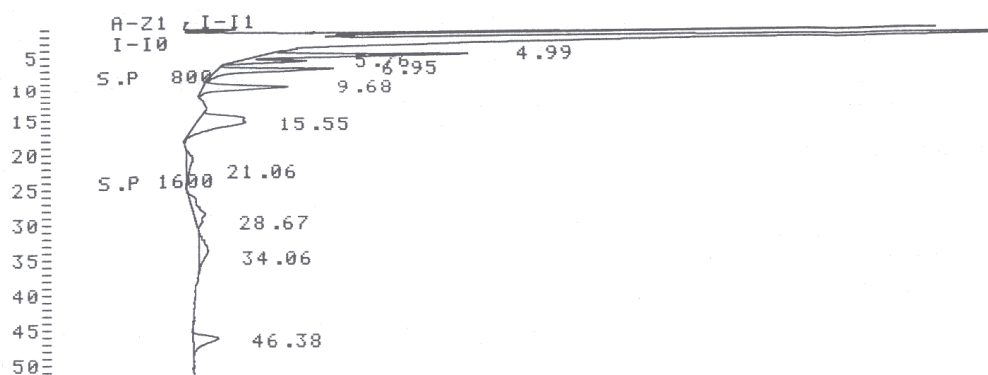
	woda	osocze
Odzysk paklitakselu	71,1±10,1	44,2±14,5
Oznaczalność paklitakselu [ng/ml]	25	25
Liniowość w zakresie 25-1000 ng/ml	$R^2 = 0,9925$	$R^2 = 0,9933$
Równanie regresji prostopadłej w zakresie 25-1000 ng/ml	$A_p/A_d = 0,9404 C + 0,0640$	$A_p/A_d = 0,6725 C + 0,0179$

Odzysk diazepamu z wody wynosił 93,8±9,3%, a z osocza 91,3±10,8%.

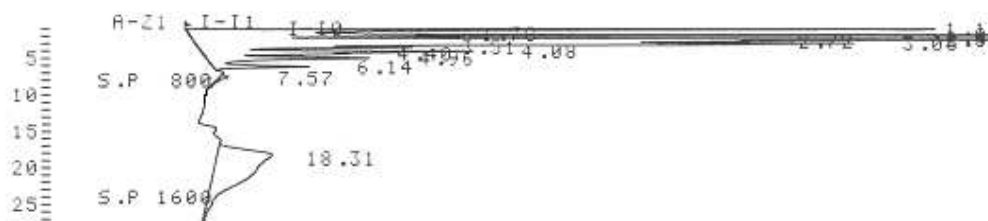
a)



b)



c)

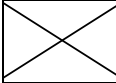


Rycina 27. Chromatogramy ekstraktów osocza krwi królika:

- po 4 h od momentu rozpoczęcia wlewu PTX-WDL ($t_r=7,08$ - pik diazepam, $t_r=10,04$ - pik paklitakselu)
- po 4 h od momentu rozpoczęcia wlewu preparatu Taxol ($t_r=6,95$ - pik diazepam, $t_r=9,68$ - pik paklitakselu)
- w czasie $t=0$ przed podaniem preparatów.

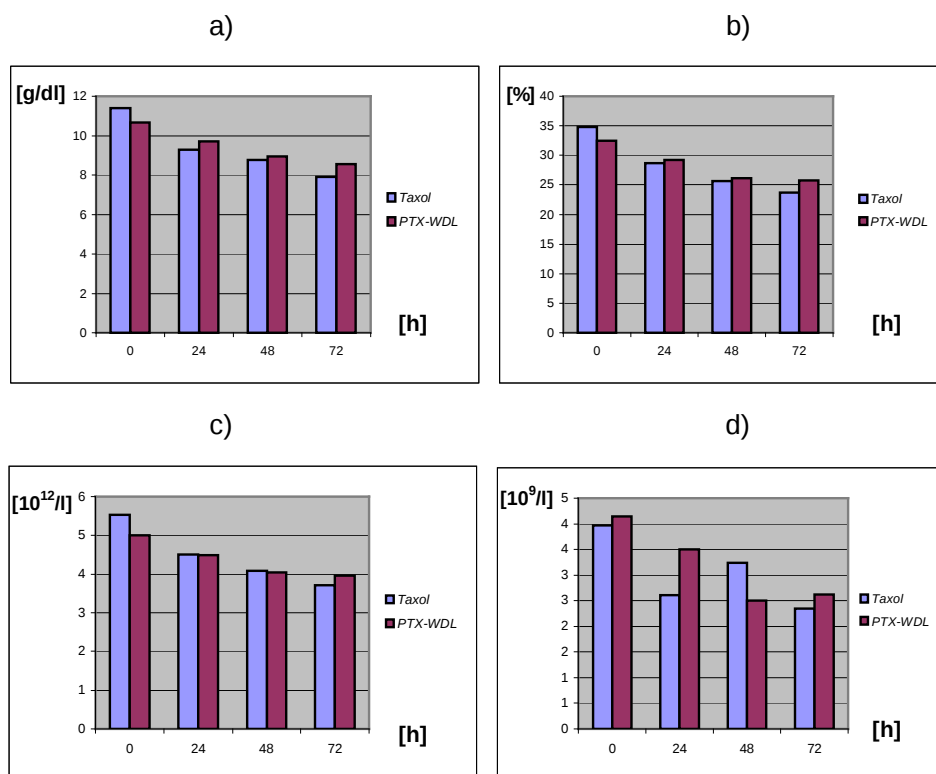
Oznaczone stężenia paklitakselu w osoczu krwi zwierząt po 4 h i 24 h od momentu rozpoczęcia wlewu dożylnego preparatu *PTX-WDL* oraz *Taxol* przedstawia *Tabela 27*. Średnie stężenia paklitakselu we krwi królików oceniono statystycznie przyjmując prawdopodobieństwo popełnienia błędu na poziomie $\alpha=0,05$ (Microsoft Excel 2000, test *t*-Studenta). Oznaczone stężenie paklitakselu po 4 h od momentu rozpoczęcia wlewu *PTX-WDL* mieściło się w zakresie 158-703 ng/ml. U siedmiu królików z dziesięciu mieściło się w zakresie 158-239 ng/ml, a u trzech wynosiło powyżej 400 ng/ml. Oznaczone w tym czasie stężenie paklitakselu po podaniu preparatu *Taxol* u sześciu królików mieściło się w zakresie 204-480 ng/ml, a u czterech królików wynosiło powyżej 650 ng/ml. Po 24 h, a więc 19 h po zakończeniu wlewu wykrywano nadal paklitaksel u większości zwierząt. Oznaczone stężenia były niższe - śr. 30 ng/ml po podaniu *PTX-WDL* oraz śr. 60 ng/ml po podaniu preparatu *Taxol*. Średnie stężenia paklitakselu w osoczu po 4 h od podania *PTX-WDL* oraz *Taxolu* różniły się statystycznie. Natomiast nie potwierdzono znamienne statystycznej różnicy w stężeniach otrzymanych po 24 h.

Tabela 27. Stężenia paklitakselu [ng/ml] w osoczu królików (n=10) po podaniu leku oryginalnego Taxol i nowego preparatu PTX-WDL

	Taxol	PTX-WDL	Taxol	PTX-WDL
L.p.	4 h		24 h	
1.	655,7	193,1	102,5	54,60
2.	1044,0	446,5	58,65	37,75
3.	360,4	455,8	32,59	36,3
4.	300,7	164,8	169,03	38,18
5.	204,4	171,6	96,28	0
6.	834,1	239,0	52,50	0
7.	408,3	182,0	0	0
8.	479,8	703,0	0	94,76
9.	418,1	157,6	27,32	0
10.	702,4	211,2	67,99	46,04
	ŚREDNIE STĘŻENIE			
	540,79	292,46	60,68	30,76
α= 0,05	p=0,02570		p=0,13877	
	ODCHYLENIE STANDARDOWE			
	262,09	182,44	51,79	31,29

U zwierząt w trakcie 96-godzinnych obserwacji nie zaobserwowano zmian stężenia enzymów - aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginowej oraz fosfatazy alkalicznej. Zmiany hematokrytu, stężenia hemoglobiny, liczby erytrocytów oraz limfocytów w trakcie 72-godzinnej obserwacji zwierząt przedstawia *Rycina 28*.

Zarówno u królików otrzymujących *Taxol* jak i *PTX-WDL* zaobserwowano spadek hematokrytu, stężenia hemoglobiny, liczby erytrocytów i limfocytów. Odnotowany poziom hematokrytu oraz liczby erytrocytów i stężenia hemoglobiny u królików otrzymujących *Taxol* był niższy od obowiązujących norm (wartości prawidłowe odpowiednio: 33-55%, $3,8 \times 10^{12}/l$ - $7,9 \times 10^{12}/l$, 9,4-17,4 g/dl) [101, 102]. Wartości tych parametrów ulegały również obniżeniu, ale w mniejszym stopniu, u królików otrzymujących *PTX-WDL*. Zarówno w grupie królików otrzymujących *PTX-WDL* jak i w grupie królików otrzymujących *Taxol* zaobserwowano podobny spadek liczby leukocytów (głównie neutrocytów) - do $4 \times 10^9/l$. Nie odnotowano zmian w obrazie krwi królików otrzymujących placebo (*C-E*, *WDL*).



Rycina 28. Zmiany stężenia hemoglobiny (a), hematokrytu (b), liczby erytrocytów (c) oraz limfocytów (d) we krwi królików otrzymujących *Taxol* oraz *PTX-WDL*.

6. BADANIE TOKSYCZNOŚCI OSTREJ NA MYSZACH

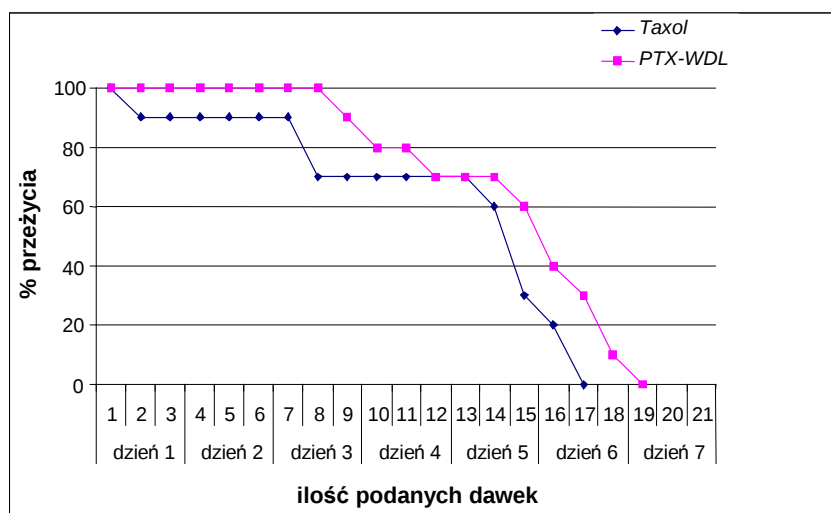
37 myszom podawano w odstępach, co najmniej 6-godzinnych, cztery preparaty: dwa preparaty placebo i dwa zawierające paklitaksel. Obserwowano zachowanie zwierząt. Przygotowanie i podawanie preparatów, przygotowanie zwierząt oraz pobieranie materiału do badań przebiegało zgodnie z opisem przedstawionym w p. 11 (*Metodyka*).

Obserwacje zwierząt

U myszy, które otrzymywały preparaty placebo nie zaobserwowano żadnych niepokojących objawów przez wszystkie dni trwania doświadczenia.

Już po podaniu myszom pierwszej dawki preparatów *Taxol* oraz *PTX-WDL* zaobserwowano nieznaczne obniżenie aktywności zwierząt, która malała stopniowo w następnych dniach. Po podaniu dwunastej dawki (w czwartym dniu doświadczenia) zaobserwowano bardzo wyraźne obniżenie aktywności zwierząt - myszy poruszały się bardzo powoli, były skulone, oszołomione, większość czasu spędzały siedząc „głową w dół” i gromadziły się w grupie w rogu klatki.

Myszy otrzymujące *Taxol* przeżywały 7-16 podań leku, natomiast myszy otrzymujące nowy lek z paklitakselem (*PTX-WDL*) przeżywały 8-18 podań leku. Śmiertelność zwierząt po podaniu preparatów *Taxol* oraz *PTX-WDL* przedstawia Rycina 29.



Rycina 29. Porównanie śmiertelność myszy po podaniu nowego preparatu z paklitakselem (*PTX-WDL*, $n=10$) oraz preparatu *Taxol* ($n=10$).

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Celem niniejszej pracy było uzyskanie nowego nośnika dla leku przeciwnowotworowego - paklitakselu. Nowy układ miał składać się wyłącznie z biozgodnych składników, ewentualnie z niewielkim dodatkiem syntetycznych surfaktantów lub współrozpuszczalników już stosowanych w celu zwiększenia rozpuszczalności leków podawanych drogą pozajelitową. Paklitaksel jest aktualnie podawany w postaci roztworów o stężeniu 30-120 mg/100 ml we wlewie dożylnym trwającym 3 lub 24 h. Z tego powodu nowy nośnik miał zapewnić rozpuszczalność substancji leczniczej co najmniej 100 mg/100 ml i trwałość fizyczną przez co najmniej 24 h. Głównym składnikiem tworzonych układów była lecytyna, a do ich modyfikacji zastosowano proces liofilizacji.

Podobnie jak w przypadku wielu leków przeciwnowotworowych, aby uniknąć groźnych działań ubocznych wymagana jest powolna infuzja dożylna roztworu paklitakselu. Podawany dożylnie przez kilka godzin i w dużych objętościach preparat powinien być biozgodny i nie może zawierać wysokich stężeń syntetycznych surfaktantów. Lecytyna nie tylko ogranicza toksyczne właściwości solubilizatorów wywołujących hemolizę krwi (np. deoksycholanu sodu), ale nośniki zawierające lecytynę mogą także redukować toksyczne działanie substancji leczniczych [103, 104]. Biorąc pod uwagę fakt podawania leków przeciwnowotworowych w wyjątkowych przypadkach (maksymalnie 6 wlewów dożylnych co 21 dni), można uznać za nietoksyczne nośniki z lecytyną nawet zawierające małe ilości surfaktantów i współrozpuszczalników.

Do tej pory lecytynę wykorzystuje się jedynie jako składnik emulsji oraz mieszanych miceli i liposomów. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej wskazują, że lecytyna może znaleźć szersze zastosowanie w technologii postaci leku. Bez dodatkowych substancji pomocniczych może być solubilizatorem dla niektórych substancji leczniczych i stanowić samodzielny nośnik dla leków [105]. Z tego powodu podjęto próbę zastosowania wodnych dyspersji lecytyny (WDL) - nie wykorzystywanych do tej pory w lecznictwie - w celu uzyskania stabilnych układów z paklitakselą i umożliwiających jego podanie we wlewie dożylnym.

W pierwszym etapie pracy zbadano rozpuszczalność paklitakselu w 3%, 5% i 10% jajowej WDL. Krystaliczna forma paklitakselu charakteryzowała się niedostateczną rozpuszczalnością i substancja rozpuszczała się bardzo wolno (*Tabela 14*). Stężenie rozpuszczonego paklitakselu 45,5 mg/100 ml uzyskiwano dopiero po 24 h. Wraz ze wzrostem stężenia lecytyny w WDL wzrastała zdolność solubilizacyjna nośnika.

Brak znaczącego zwiększenia rozpuszczalności krystalicznego paklitakselu w jajowej WDL spowodował podjęcie próby zastosowania amorficznej formy substancji leczniczej. W tym celu wykorzystano opracowaną w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej i opatentowaną metodę otrzymywania amorficznego paklitakselu z zastosowaniem procesu liofilizacji roztworu paklitakselu w mieszaninie dioksanu i wody [98]. Jak

zaobserwowano pod mikroskopem, cząstki tak otrzymanej substancji mają nieregularny kształt, wielkość 3-5 μm i nie występują wśród nich kryształy paklitakselu (*Rycina 11*). Badania mikrokalorymetryczne także potwierdziły amorficzny charakter substancji [98].

Zastosowanie amorficznej formy substancji znacznie zwiększyło rozpuszczalność paklitakselu zarówno w jajowej jak i sojowej WDL. Amorficzna forma substancji rozpuszczała się bardzo szybko w wodnych dyspersjach lecytyny - już w ciągu 2-5 min otrzymywano maksymalne stężenie rozpuszczonego leku w układzie.

Zwiększoną rozpuszczalność amorficznego paklitakselu osiągnięto we wszystkich badanych układach zawierających lecytynę jako substancję pomocniczą (*Tabela 14*). Najwyższą rozpuszczalność uzyskano w 5% dyspersji lecytyny jajowej (511,5 - 580 mg/100 ml). Należy zwrócić uwagę, że obserwowano dużą powtarzalność rozpuszczalności paklitakselu w WDL przygotowanych z lecytyny pochodzącej z różnych serii producenta (*Tabela 15*), chociaż lecytyna uważana jest za substancję o stosunkowo mało powtarzalnych właściwościach. W 5% sojowej WDL osiągnięto równie wysoką rozpuszczalność paklitakselu - 580 mg/100 ml. Układy zawierające amorficzny paklitaksel i WDL charakteryzowały się odmienną trwałością fizyczną w trakcie 24 h. W tym czasie stężenie rozpuszczonego paklitakselu zmalało we wszystkich układach WDL, ale w różnych stopniu. Układy zawierające 5% jajową WDL odznaczały się zadowalającą trwałością. Tylko w jednym przypadku stężenie rozpuszczonego paklitakselu spadło w trakcie 24 h poniżej 400 mg/100 ml, podczas gdy w pozostałych układach wynosiło 475 - 553 mg/ml (*Tabela 15*). Niestety w dyspersji lecytyny sojowej w trakcie 24 h następowało wytrącenie substancji i zmniejszenie stężenia rozpuszczonego paklitakselu znacznie większe niż w dyspersji lecytyny jajowej (do 103,5 mg/100 ml) (*Tabela 14*). Odmienne właściwości solubilizacyjne dyspersji lecytyny sojowej, w porównaniu z lecytiną jajową, mogą wynikać z innego składu chemicznego.

Należy spodziewać się zwiększenia stabilności otrzymanych układów, jeśli obniży się stężenie paklitakselu poniżej stanu nasycenia i brak będzie w układzie fazy stałej, sprzyjającej krystalizacji. Zjawisko takie zaobserwowano podczas prowadzonych badań *in vivo*. Nie zaistniały wtedy jakiegokolwiek problemy ze stabilnością fizyczną przez 24 h w układzie zawierającym lek w stężeniu 100 mg/100 ml rozpuszczony w 5% jajowej WDL. Zjawisko zmniejszenia rozpuszczalności w czasie 24 h wskazuje, że w tych badaniach otrzymywano początkowo roztwory przesycone, co dodatkowo sprzyja rekrystalizacji substancji. Ponadto, co zostało zamierzone w celu pracy, układy wytrząsano podczas 24 h obserwacji, a więc był to dodatkowy czynnik, który zmniejsza trwałość fizyczną układu.

Spodziewano się, że zastosowanie homogenizacji wysokociśnieniowej może znacząco wpłynąć na zdolność solubilizacyjną nośników. Nie można jednoznacznie

stwierdzić, czy rozpuszczalność paklitakselu w układach poddanych homogenizacji jest wyższa (str. 68) - w przypadku jajowej WDL homogenizacja prowadziła do otrzymania roztworów paklitakselu mniej stabilnych w czasie 24 h, a w przypadku sojowej WDL efekt był odwrotny (*Tabela 14*).

Proces liofilizacji ogranicza niekorzystne zmiany zachodzące w układach fosfolipidowych. Jako, że suszenie sublimacyjne zostało wykorzystane do uzyskania amorficznej formy paklitakselu, postanowiono zastosować je również do modyfikacji nośników dla substancji leczniczej. Zmiany struktury nośnika w trakcie liofilizacji mogą spowodować zmianę ich właściwości solubilizacyjnych. Liofilizowane układy odtwarzano w wodzie i badano rozpuszczalność paklitakselu.

Liofilizacja nośnika z lecytyną jajową nie tylko nie zwiększyła rozpuszczalności paklitakselu, ale spowodowała jej spadek (*Tabela 14*). W liofilizowanej dyspersji lecytyny jajowej 3,3% rozpuszczalność amorficznego paklitakselu było co najmniej 7-krotnie niższa niż w analogicznym układzie nieliofilizowanym.

Ponieważ liofilizacja samego nośnika nie przyniosła spodziewanych efektów, podjęto próbę przygotowania układów współliofilizowanych - liofilizatów do rozpuszczania *ex tempore*. W układach współliofilizowanych z lecytyną jajową maksymalne stężenie rozpuszczonego paklitakselu jakie udało się uzyskać to 52 mg/100 ml i utrzymywało się ono na podobnym poziomie przez 24 h. Współliofilizacja leku z lecytyną sojową dała znacznie gorsze efekty, a maksymalne stężenie rozpuszczonego leku osiągnięto dopiero po 24 h (*Tabela 14*), co wskazywałoby na istnienie formy krystalicznej paklitakselu w liofilizacie.

W celu dalszej modyfikacji układów i zwiększenia rozpuszczalności paklitakselu zastosowano dodatkowe surfaktanty dopuszczone do stosowania w lekach pozajelitowych: poloksamer, makrogol, chlorek benzalkoniowy, a przede wszystkim deoksycholan sodu. Aktualnie w lecznictwie dostępnych jest kilka preparatów w formie mieszanych miceli zawierających fosfolipidy oraz sole kwasów żółciowych (*Wstęp*, Rozdział 6), dlatego podjęto próbę zastosowania tych układów także w celu solubilizacji paklitakselu.

Badano rozpuszczalność paklitakselu krystalicznego oraz amorficznego w mieszanych micelach zawierających lecytynę jajową i deoksycholan sodu w różnych stężeniach, a także w nośniku liofilizowanym i odtworzonym *ex tempore*. Krystaliczna forma paklitakselu charakteryzowała się bardzo małą rozpuszczalnością, tak jak w przypadku dyspersji lecytyny (*Tabela 14* i *18*) i dopiero zastosowanie amorficznej formy znacznie zwiększyło jej rozpuszczalność. Podobnie jak w przypadku WDL, już w ciągu 2-5 min otrzymywano maksymalne stężenie rozpuszczonego leku w układzie. Wadą wielu z badanych układów okazała się jednak zbyt krótka trwałość fizyczna. Tylko w dwóch

układach (**LedP8**, **LsdP2**) po 24 h stężenie rozpuszczonego paklitakselu nadal wynosiło co najmniej 100 mg/100 ml.

W układach współliofilizowanych badano zależność rozpuszczalności od stosunku paklitaksel : lecytyna : deoksycholan sodu. We wszystkich układach zawierających lecytynę jajową w stężeniu $\geq 1\%$ zaobserwowano bezpośrednio po rozpuszczeniu liofilizatów stężenie rozpuszczonego paklitakselu przynajmniej 100 mg/100 ml (*Tabela 18*). Uważa się, że w najbardziej optymalnych układach mieszanych miceli molowy stosunek lecytyny jajowej do deoksycholanu sodu wynosi 0,8 [106]. Przeprowadzone doświadczenia wskazują, że najkorzystniejszy dla rozpuszczalności paklitakselu układ zawiera lecytynę jajową i deoksycholan sodu w stosunku molowym - 0,52 (2,5%-2,5%). Różnica między uzyskanymi wynikami a danymi literaturowymi może wynikać z efektu przesylenia roztworów otrzymywanych w dyspersjach mieszanych miceli. Oznaczona w tym układzie rozpuszczalność paklitakselu wynosiła 181 mg/100 ml i nie uległa zmianie przez 24 h (*Tabela 18*). Alkan-Onyuksek i in. [107] również solubilizowali paklitaksel za pomocą mieszanych miceli, lecz maksymalne stężenie paklitakselu jakie udało się uzyskać tym autorom było znacznie niższe, tzn. 79,5 mg/100ml.

Zastosowana została także wielokrotna liofilizacja układów zawierających lecytynę jajową i deoksycholan sodu. Powszechnie w celu zwiększenia wydajności „zamykania” substancji w lipidowych pęcherzykach (liposomach) wykorzystuje się kilkukrotne zamrażanie i rozmrażanie [108, 109]. Niestety, w przypadku mieszanych miceli wielokrotne suszenie sublimacyjne nie pozwoliło na uzyskanie wyższych stężeń rozpuszczonego paklitakselu w porównaniu z układami liofilizowanymi jednokrotnie (*Tabela 19*). Ponadto, zastosowanie mieszaniny dioksanu i wody (1:4), jako rozpuszczalnika między kolejnymi etapami liofilizacji, spowodowało znaczne obniżenie rozpuszczalności substancji leczniczej.

Dodatek innych surfaktantów nie zwiększył rozpuszczalności paklitakselu w żądanym stopniu. Span spowodował obniżenie rozpuszczalności paklitakselu (*Tabela 21*). Również współliofilizacja leku z lecytyną jajową i makrogolem lub chlorkiem benzalkoniowym spowodowała zmniejszenie rozpuszczalności paklitakselu. Współliofilizacja paklitakselu z lecytyną jajową i poloksamerem pozwoliła na uzyskanie rozpuszczalności paklitakselu na poziomie zbliżonym do układów bez poloksameru. Zaletą jednak tego układu było, że w czasie 24 h nie dochodziło do wytrącenia rozpuszczonego paklitakselu, co potwierdziło fakt, że poloksamer stabilizuje układy dyspersyjne [110].

Początkowo jako rozpuszczalnika dla liofilizatów używano wyłącznie wody. Zastosowanie innych rozpuszczalników miało na celu dalsze zwiększenie rozpuszczalności i poprawę trwałości fizycznej roztworów paklitakselu. W pierwszej kolejności użyto wody z glicerolem, a następnie wodnych roztworów surfaktantów stosowanych aktualnie w preparatach podawanych drogą pozajelitową (poloksamer,

Tween), a także emulsji do żywienia pozajelitowego. Ta modyfikacja także nie wpłynęła znacząco na zwiększenie rozpuszczalności substancji leczniczej lub na trwałość układów (Tabela 21).

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że żądana rozpuszczalność, tzn. ok. 100 mg/100 ml została osiągnięta pierwotnie w kilku układach, jednak stężenie takie zostało utrzymane przez okres 24 h tylko w 3% i 5% WDL zawierającej lecytynę jajową, w 1% i 5% WDL zawierającej lecytynę sojową oraz w dyspersji otrzymanej z zastosowaniem współliofilizowanego paklitakselu z mieszanymi micelami (2,5% lecytyny jajowej i 2,5% deoksycholanu sodu). Wśród tych układów najbardziej obiecujące są układy WDL, jako że obecność deoksycholanu sodu nie powoduje dalszego zwiększenia rozpuszczalności substancji leczniczej. Rozpuszczalność paklitakselu 100 mg/100 ml osiągnięto już w układzie zawierającym 1% lecytyny jajowej i 0,2% deoksycholanu sodu, jednak zadowalającą trwałością fizyczną charakteryzował się dopiero układ zawierający lecytynę jajową i deoksycholan sodu w równym stężeniu - 2,5%. Zastosowanie samej lecytyny, a więc układu WDL jest korzystniejsze niż mieszanych miceli ze względu na większą toksyczność deoksycholanu i jego ograniczoną ilość, jaka może być podana drogą dożylną (LD_{50} u szczurów 150 mg/kg) [111].

Rozpuszczalność paklitakselu osiągnięta w badaniach innych autorów, w zależności od przygotowanej postaci leku została przedstawiona w Tabeli 28. W porównaniu z dotychczas publikowanymi wynikami, uzyskana rozpuszczalność paklitakselu w dyspersjach lecytyny jest bardzo dobrym wynikiem. Tylko w emulsjach zawierających witaminę E (układ nr 2 i 3) uzyskano większą rozpuszczalność niż w WDL. Zbliżoną rozpuszczalność uzyskano w roztworach solubilizowanych zawierających polisorbát (układ nr 9 i 10), ale są to koncentraty, które rozcieńcza się przed podaniem pacjentowi i w końcowym roztworze stężenie leku jest znacznie niższe. Niezaprzecalną zaletą otrzymanych w niniejszej pracy układów jest ich biogodność i brak w składzie syntetycznych surfaktantów.

Tabela 28. Rozpuszczalność paklitakselu w eksperymentalnych układach do podania dożylnego

NR	SKŁAD	ROZPUSZCZALNOŚĆ. [mg/100 ml]	PIŚMIENNICTWO
EMULSJE			
1.	mieszanina olejów 10% fosfatydylocholina jajowa 4% Tween 80 3% glicerol 2,25%	75	[112]
2.	Tocolol: zawiera m. in. witaminę E, TPGS (α -tocopheryl polyethylene glycol succinate) i poloksamer 407	1000	[113]
3.	witamina E 20% glicerol 2,25% deoksycholan sodu 0,4% kwas deoksycholowy 0,3% Lipoid E80 2%	2500	[114]
4.	PEG 400 3% glukoza 5% olej sojowy 5,5% PEG-DSPE 0,218% polisorbat 80 3,6%	60	[115]
MIESZANE MICELE			
5.	lecytyna jajowa + deoksycholan sodu	79,5	[107]
6.	5 mM (90:10) PEG(2000)-DSPE + fosfatydylocholina jajowa	47,5	[116]
LIPOSOMY			
7.	78 mM (90:10) fosfatydylocholina + fosfatydyloglicerol	200	[117]
ROZTWORY SOLUBILIZOWANE			
8.	N,N-dietylonikotynamid 2%	98	[118]
9.*	PEG 400 29,4% polisorbat 80 48,5% etanol 22,1%	600	[119]
10.*	etanol 30% polisorbat 80 10% Pluronic L64 60%	500	[120]

* - koncentraty do rozcieńczania przed podaniem pacjentowi

Ponieważ WDL stanowiły podstawowy nośnik dla paklitakselu, w kolejnym etapie pracy bliżej scharakteryzowano ich właściwości fizykochemiczne.

W Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej w ostatnich latach przeprowadzono badania dotyczące długoterminowej stabilności WDL oraz ich właściwości solubilizacyjnych, a także kinetyki uwalniania substancji z dyspersji [99, 105]. Udowodniono, że WDL zapewniają 2-7 -krotny wzrost rozpuszczalności dla substancji charakteryzujących się log P 3,3 i mniejszym, natomiast nawet 60-krotny wzrost rozpuszczalności notowano dla najbardziej lipofilowego estradiolu. Na podstawie

trwających od lat badań nad WDL można stwierdzić, że dyspergując fosfolipidy w wodzie, bez stosowania specjalnych procedur jak przy otrzymywaniu liposomów, można uzyskać układ o znaczących właściwościach solubilizujących. Jednak jak do to pory, układ o takim składzie i technologii sporządzania nie został wykorzystany w lecznictwie.

Wielkość cząstek fosfolipidowych oraz zmiana ich wielkości podczas wyjąławiania i przechowywania może być znaczącym czynnikiem wpływającym na zdolność lecytyny do solubilizacji substancji leczniczej. W dyspersjach lecytyny jajowej oraz sojowej następował wzrost wielkości cząstek w trakcie wyjąławiania, a szczególnie w trakcie przechowywania przez 6-18 miesięcy. Niewyjąłowione dyspersje lecytyny jajowej charakteryzowały się mniejszymi cząstkami niż analogiczne dyspersje lecytyny sojowej. Po wyjąłowieniu większość cząstek w jajowej WDL miała średnicę powyżej 1 μm , a w sojowej WDL - powyżej 5 μm (Tabela 22 i 23). W trakcie 6 miesięcy nastąpiło zwiększenie wielkości cząstek i większość cząstek w jajowej WDL miała średnicę poniżej 20 μm , a w sojowej WDL poniżej 70 μm . Dodatek buforu hamował powstawanie dużych aglomeratów w trakcie przechowywania układów (Tabela 22 i 23), co zaobserwowano także we wcześniejszych badaniach. Obecność buforu w dyspersji lecytyny sojowej zapewniła najmniejsze wartości $d_{(0,5)}$ oraz $d_{(\text{max})}$. Wszystkie cząstki buforowanej dyspersji lecytyny jajowej miały średnicę poniżej 5 μm .

Zmiana parametrów fizycznych badanych dyspersji w trakcie przechowywania świadczy zapewne o zachodzących w układzie zmianach chemicznych. Jednak trzeba zauważyć, że w żadnej dyspersji obserwowanej pod mikroskopem optycznym nie wykryto cząstek powyżej 10 μm . Wskazuje to, że metoda oceny wielkości cząstek za pomocą dyfraktometrii laserowej nie jest właściwa dla tego typu układów. Również badania *in vivo* dowodzą, że nie były obecne w podawanych preparatach cząstki o wielkości kilkudziesięciu μm - u zwierząt nie pojawiły się żadne objawy związane z podaniem dożylnie cząstek powyżej 5 μm . Z tego powodu wydaje się być słuszne branie pod uwagę podczas analizy uzyskanych wyników za pomocą dyfraktometru laserowego tylko tego zakresu pomiaru średnicy cząstek, w którym znajduje się najwięcej cząstek układu (np. mediany średnicy $d_{(0,5)}$). Wyniki badań mikroskopowych dowodzą, że analiza wielkości cząstek w dyspersji lecytyny z zastosowaniem dyfrakcji laserowej może być wiarygodna tylko w zakresie wielkości cząstek do ok. 10 μm .

W trakcie przygotowywania WDL zastosowano modyfikację polegającą na wysokociśnieniowej homogenizacji dyspersji. Proces ten, poprzez wpływ na rozkład wielkości cząstek oraz strukturę lipidów, może znacząco zmienić trwałość układów oraz właściwości solubilizacyjne dyspersji. Homogenizowane dyspersje lecytyny jajowej i sojowej charakteryzowały się najmniejszymi wartościami $d_{(0,5)}$ (Tabela 22 i 23). Ponadto sojowa WDL cechowała się najmniejszą wartością absorbancji (co znalazło odzwierciedlenie w największej klarowności tej dyspersji) i tylko niewielkimi zmianami pH

w trakcie przechowywania układu w temperaturze pokojowej. Mało prawdopodobny wydaje się być uzyskany rozkład wielkości cząstek po 6 miesiącach przechowywania układu, gdyż dyspersja ta, jak już wspomniano, odznaczała się najwyższą klarownością. Tymczasem rozkład wielkości cząstek wskazuje wyraźnie, że w układzie obecne jest duża grupa cząstek o średnicy powyżej 10 μm (*Tabela 23, Rycina 19*). Rozbieżności te potwierdzają zawarte powyżej wnioski na temat analizy z użyciem dyfraktometru laserowego. Homogenizowane dyspersje lecytyny jajowej, podobnie jak sojowej WDL, cechowały się najniższą absorbancją, jednak nie były aż tak klarowne. W trakcie przechowywania zaobserwowano wzrost wielkości cząstek w porównaniu z układami niepoddanymi homogenizacji, a także w porównaniu z homogenizowanymi dyspersjami lecytyny sojowej (*Tabela 22*).

W literaturze wskazuje się, że w układach zawierających fosfolipidy obecne są takie struktury jak micle, liposomy, struktury sieciowe, ciekłe kryształy oraz nanocząstki [121-124]. Wstępne badania z użyciem mikroskopii elektronowej wykazały obecność złożonych agregatów. Nie znaleziono liposomów, chociaż ich obecność nie jest wykluczona [99]. Na różnice w strukturze dyspersji wskazuje także przeprowadzona w niniejszej pracy analiza za pomocą ESR, gdyż oba rodzaje układów charakteryzują się inną lepkością mikrośrodowiska oraz jego polarnością (str.87). Charakterystyczny jest jednak brak różnic w dystrybucji wolnych rodników w dyspersjach lecytyny otrzymanych w wyniku procesu homogenizacji lub zawierających dodatkowe składniki.

Wodne dyspersje zawierające lipidy są podatne na procesy utleniania i hydrolizy. Reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych łatwo ulegają procesom utleniania, w wyniku czego powstają produkty, które mogą negatywnie wpływać na jakość i trwałość preparatów opartych na lecytynie. Z tego powodu częściowe uwodornienie łańcuchów tłuszczowych lecytyny zmniejsza jej wrażliwość na utlenianie. Ze względu na swój skład lecytyna sojowa, bogatsza w nasycone kwasy tłuszczowe, charakteryzuje się mniejszą podatnością na procesy utleniania w porównaniu z lecytyną jajową [125-127]. W przypadku WDL obserwowano mniejsze zmiany barwy tych dyspersji w trakcie przechowywania.

Na trwałość układu korzystnie wpływa usunięcie tlenu przez wysycenie go gazem obojętnym, np. azotem, co wykonywano podczas sporządzania WDL. Aby zapobiec utlenianiu łańcuchów lipidowych lecytyny można także dodać do preparatu naturalnego przeciwutleniacza, jakim jest α -tokoferol (witamina E) [99], jednak nie stosowano takich substancji pomocniczych w obecnych badaniach.

Proces hydrolizy jest spowodowany zachodzącą w obecności wody hydrolizą wiązań estrowych fosfolipidów i prowadzi do powstania lizofosfolipidów oraz wolnych kwasów tłuszczowych. Hydroliza zachodzi zarówno podczas wyjaławiania termicznego jak i długotrwałego przechowywania. Ochrona układu przed procesami hydrolizy polegać

może na wyeliminowaniu z jego środowiska wody, a więc korzystne jest przechowywanie preparatu w postaci liofilizatu [125-127]. Jednak w przypadku paklitakselu badania rozpuszczalności wskazują, że liofilizacja nośników zawierających lecytynę nie wpłynęła korzystnie na rozpuszczalność substancji leczniczej (*Tabela 14*).

Wcześniejsze badania przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej [99, 105] wskazują, że mimo wzrostu liczby kwasowej w trakcie 11 miesięcy przechowywania (z 11,6 do 14,9), układ nadal odpowiadał pod tym względem wymogom farmakopealnym (wg USP 30/NF 25 wartość ta powinna być nie większa niż 36). Dyspersje lecytyny jajowej z dodatkiem buforu fosforanowego nie ulegały istotnym zmianom (wielkość cząstek, potencjał zeta, pH podczas przechowywania nawet przez okres 11-17 miesięcy), co potwierdzono także w niniejszej pracy [99]. Układy buforowane charakteryzowały się dużą stabilnością pod względem wartości pH, a absorbancja tych układów była najwyższa (*Tabela 22 i 23*). Należy jednak zwrócić uwagę, że obecność buforu w preparacie przeznaczonym do podawania w postaci kikugodzinnego wlewu dożylnego nie jest wskazana.

W *Tabeli 29* podsumowano wyniki analizy fizykochemicznej dyspersji lecytyny jajowej i sojowej. Tabela ta stanowi pewne podsumowanie wyników przedstawionych w *Tabelach 22 i 23*.

Tabela 29. Posumowanie zmian zachodzących w czasie w dyspersjach lecytyny jajowej i sojowej (niezawierających buforu i niepoddanych homogenizacji wysokociśnieniowej)

PO SPORZĄDZENIU		JAJOWA	SOJOWA
	Barwa	kremowo-żółta	jasnokremowa
	Przejrzystość*	+++	++
	Cząstki d(0,5)	<1 µm	<5 µm
	pH	5,9	5,9
PRZECHOWYWANIE 6 MIESIĘCY	Barwa	ciemniej (ciemnożółta)	jaśniej (mleczne zabarwienie)
	Przejrzystość	bez zmian	łatwo dyspergowalny osad
	Cząstki d(0,5)	<5 µm	<5 µm
	pH	5,5	5,9

* +++ - mała
++ - średnia

Dyspersje lecytyny jajowej i sojowej cechują zbliżone wartości pH oraz absorbancji bezpośrednio po przygotowaniu, po wyjałowieniu oraz w trakcie przechowywania. Właściwości układów podczas przechowywania (6-18 miesięcy) ulegały niedużym zmianom. Nawet, jeśli w przypadku sojowej WDL dochodziło do wytrącenia cząstek fosfolipidowych, już silne, krótkie wstrząśnięcie powodowało ponowne uzyskanie

homogennego układu. W przypadku niehomogenizowanych dyspersji lecytyny jajowej i sojowej w trakcie 6 miesięcy pH nie spadło poniżej 5,5. Jedynie w przypadku jajowej WDL poddanej homogenizacji wysokociśnieniowej nastąpiło wyraźne obniżenie wartości pH w trakcie przechowywania (Tabela 22 i 23).

Im większa jest jednorodność wchodzących w skład lecytyn fosfolipidów, a więc im większy stopień oczyszczenia i zawartość fosfatydylocholiny, tym mniejsza podatność układu na procesy chemiczne i zmiany fizyczne [126]. Potwierdzają to obserwacje wizualne dyspersji o wysokiej zawartości fosfatydylocholiny. Z tego względu niekorzystnie wpływające na trwałość dyspersji procesy można również ograniczyć przez zmianę właściwości samej lecytyny, np. zastosowanie oczyszczonej fosfatydylocholiny (główny składnik lecytyny).

Sporządzone dyspersje oczyszczonej fosfatydylocholiny charakteryzowały się najmniej widocznymi zmianami barwy w trakcie przechowywania (Tabela 25). Odnotowane wartości absorbancji tych dyspersji były wyższe w porównaniu z dyspersjami lecytyny jajowej i sojowej, a w trakcie 6 miesięcy pH układów uległo nieznacznym zmianom. Niestety, ze względu na wysoki koszt oczyszczonej fosfatydylocholiny, producenci starają się w pierwszej kolejności wykorzystać do produkcji lecytynę jajową mniej oczyszczoną, ale o odpowiedniej zawartości fosfatydylocholiny wymaganej w postaci leku.

Pojawiające się problemy dotyczące trwałości WDL wynikają zapewne z niewystarczającej jeszcze wiedzy na temat właściwości fizykochemicznych tych układów. W lecznictwie już od ponad 50 lat stosuje się emulsje - preparaty, w których podobnie jak w WDL faza lipidowa ma kontakt z fazą wodną. Mimo to, udało się uzyskać odpowiednią trwałość emulsji i należy sądzić, że również trwałość WDL nie będzie budzić zastrzeżeń, chociaż niezbędne są dalsze badania.

Obecne badania fizykochemiczne oraz badania *in vivo* na zwierzętach wskazują, że mimo zmian zachodzących w układach w trakcie wyławiania i przechowywania, możliwe jest uzyskanie WDL o odpowiednich właściwościach i stabilności chemicznej, umożliwiających ich podanie dożylnie.

Do tej pory podjęte badania obejmowały jedynie fizykochemiczną charakterystykę WDL oraz badania ich zdolności solubilizacyjnych. Na podstawie badań trwałości, wielkości cząstek dyspersji oraz pomiarów pH stwierdzono możliwość przeprowadzenia pierwszych doświadczeń *in vivo* i dożylnego podania nowych układów królikom. Do badań wybrano preparat sporządzony przez rozpuszczenie amorficznego paklitakselu w dyspersji lecytyny jajowej (WDL 5%). Dzięki zastosowaniu amorficznej postaci leku możliwe było uzyskanie w takiej dyspersji rozpuszczalności ponad 500 mg/100 ml. Do podania królikom wybrano stężenie zgodne ze stężeniem stosowanym w praktyce klinicznej tj. 100 mg/100 ml. W celu oceny toksyczności nowego nośnika królikom

podawano także samą dyspersję lecytyny jajowej 5%. Jako preparat odniesienia zastosowano lek oryginalny *Taxol* oraz nośnik jaki występuje w preparacie *Taxol* (Cremophor EL z etanolem).

Wlew dożylny trwał 5 h, a czas obserwacji zwierząt wynosił do 96 h, gdyż zmiany biochemiczne mogą nastąpić dopiero po kilkudziesięciu godzinach od podania leku. U pacjentów leczonych za pomocą paklitakselu obserwuje się przede wszystkim mielosupresję (im krótszy wlew tym rzadziej występuje), trombocytopenię (11%), niedokrwistość (64%), reakcje nadwrażliwości (34%), niedociśnienie (22%), bradykardię (5%), neuropatię obwodową (66%), bóle stawów i mięśni (60%), łysienie, nudności i wymioty (43%), biegunkę (28%), podwyższenie aktywności aminotransferazy alaninowej, asparaginowej oraz zwiększenie stężenia bilirubiny i odczyny w miejscu wstrzyknięcia [28, 29].

Zarówno u zwierząt otrzymujących wlew dożylny z paklitakselem jak i placebo (*WDL*) nie zaobserwowano zmian w zachowaniu. Po podaniu paklitakselu w *WDL* doszło, podobnie jak u ludzi, spadek stężenia hemoglobiny, ilości leukocytów (głównie neutrocytów), a także ilości erytrocytów oraz hematokrytu (*Rycina 28*). Podobne zmiany jak po podaniu paklitakselu w *WDL* wystąpiły u królików otrzymujących *Taxol*, jednak były bardziej nasilone. Podobnie jak w grupie otrzymującej placebo - *WDL*, tak i w grupie otrzymującej placebo dla *Taxolu* nie zaobserwowano zmian biochemicznych. Wskazuje to przede wszystkim na działanie toksyczne leku, a nie nośników solubilizujących i pozwala traktować *WDL* jako bezpieczny nośnik podczas podawania w kilkugodzinnym wlewie dożylnym.

Nie zaobserwowano wizualnie zmian w okolicy miejsca podawania preparatów. Zmiany odnotowane w wyniku badania histopatologicznego (str. 88) są prawdopodobnie wynikiem zastosowanej techniki podawania preparatów, gdyż wystąpiły u królików we wszystkich grupach.

Stężenie paklitakselu w osoczu królików analizowano metodą HPLC z zastosowaniem wzorca wewnętrznego - diazepamu. Oceniono liniowość, powtarzalność i dokładność metody (str. 89). Walidując metodę z użyciem osocza otrzymano o wiele niższy odzysk paklitakselu (44%) niż diazepamu (91%). Pomimo to, obliczeń dokonywano uwzględniając wzorzec wewnętrzny [128].

Po 4 h podawania preparatu *Taxol* uzyskano stężenia paklitakselu we krwi królików od 204 do 1044 ng/ml, natomiast po podaniu *PTX-WDL* uzyskano stężenia niższe od 157 do 455 ng/ml (*Tabela 27*). Porównanie średnich stężeń wskazuje na niższe stężenie po podaniu paklitakselu w *WDL* (292 ng/ml) niż po podaniu *Taxolu* (540 ng/ml). Pomimo dużych rozrzutów uzyskane wyniki różnią się statystycznie. Zaobserwowane duże różnice w stężeniach paklitakselu uzyskiwanych w jednej grupie królików można tłumaczyć w różny sposób. Na przykład brak modyfikacji dawki w zależności od wagi zwierząt mógł

przyczynić się do różnic w uzyskiwanych stężeniach leku w osoczu krwi. Być może zaistniały różnice w szybkości wlewu dożylnego. Ponieważ paklitaksel cechuje się nieliniową farmakokinetyką, wzrost stężenia paklitakselu we krwi nie jest proporcjonalny do zwiększenia podanej dawki leku. Dodatkowo paklitaksel jest substancją, która w bardzo dużym stopniu wiąże się z białkami osocza [16, 21]. Być może tak duże rozrzuty stężeń paklitakselu w osoczu wynikają z faktu niepowtarzalnego wiązania się leku z białkami osocza. Różnice w stężeniu we krwi paklitakselu po podaniu preparatów *Taxol* oraz paklitakselu w WDL mogą być również spowodowane odmienną farmakokinetyką substancji po podaniu jej w formie dyspersji zawierającej lecytynę jajową, szybszym wychwycie cząstek przez układ siateczkowo-śródbłonkowy i eliminacją z organizmu [118]. Problem ten wymaga dalszych badań na większej grupie zwierząt.

Po dowiedzeniu bezpieczeństwa stosowania nowego preparatu w badaniach *in vivo* na królikach, podjęto próbę oceny jego toksyczności ostrej na myszach. Spodziewano się mniejszej toksyczności nowego preparatu ze względu na obecność w nim fosfolipidów, którym przypisuje się redukcję toksyczności leków i substancji pomocniczych obecnych w układzie [103, 129]. Dawka powodująca śmierć co najmniej 50% myszy dla *Taxolu* wyniosła 210 mg/kg podanych w 14 dawkach po 0,3 mg w odstępach co najmniej 6-godzinnych, a dla paklitakselu w WDL wyniosła 225 mg/kg (w 15 dawkach) (*Rycina 29*). Ponieważ w badaniu brała udział mała grupa zwierząt, na tym etapie można nie można wnioskować, iż toksyczność nowego nośnika jest niższa od już stosowanego w leczeniu. W literaturze znaleźć można jednak informacje o mniejszej toksyczności preparatów zawierających fosfolipidy (liposomy) w porównaniu z lekiem oryginalnym [129].

W wyniku przeprowadzonych badań udało się uzyskać układ zawierający tylko biozgodne składniki, trwały przez okres co najmniej 24 h i zapewniający rozpuszczalność paklitakselu na poziomie 100 mg/100 ml. Otrzymanie takiego układu powiodło się dzięki zastosowaniu nowej technologii sporządzania wodnych dyspersji lecytyny oraz modyfikacji fizycznej paklitakselu metodą liofilizacji. Badania *in vivo* wskazują na zbliżoną toksyczność *PTX-WDL* do leku oryginalnego i prawdopodobnie na odmienną farmakokinetykę paklitakselu po podaniu go w formie dyspersji lecytyny jajowej. Uzyskany nośnik być może da się zastosować także w celu zwiększenia rozpuszczalności innych substancji leczniczych nierozpuszczalnych lub trudno rozpuszczalnych w wodzie. Problem trwałości nowych nośników zawierających lecytynę wymaga jednak kontynuacji badań.

VI. WNIOSKI

1. Dzięki zastosowaniu amorficznej formy paklitakselu można przygotować *ex tempore* infuzyjne roztwory paklitakselu w biozgodnych nośnikach submikronowych: wodnych dyspersjach lecytyny lub mieszanych micelach (lecytyna z deoksycholanem sodu). Roztwory o stężeniu paklitakselu 100 mg/100 ml lub wyższym są fizycznie trwałe przez co najmniej 24 h po przygotowaniu.
2. Jako optymalny nośnik dla paklitakselu wytypowano 5% wodne dyspersje lecytyny. Rozpuszczalność paklitakselu w 5% dyspersji lecytyny jajowej wynosiła ok. 500 mg/100 ml. Dyspersje lecytyny sojowej (1% i 5%) zapewniały mniejszą stabilność fizyczną roztworom paklitakselu w stężeniach wyższych niż 100 mg/100 ml. Dodatek innych surfaktantów (poloksamer, Span, chlorek benzalkoniowy) nie pozwalał na dalsze zwiększenie rozpuszczalności.
3. Nie udało się uzyskać odpowiedniej rozpuszczalności amorficznego paklitakselu w dyspersjach lecytyny i mieszanych micelach poddawanych liofilizacji. Również współliofilizacja paklitakselu z lecytiną lub mieszanymi micelami nie prowadziła do uzyskania żądanej rozpuszczalności (co najmniej 100 mg/100 ml).
4. W czasie długoterminowego przechowywania (18 miesięcy) wodnych dyspersji lecytyny zachodzą w nich zmiany fizykochemiczne (spadek pH, wzrost wielkości cząstek, zmiana wyglądu) wpływające na zdolność rozpuszczania paklitakselu. Mimo to rozpuszczalność paklitakselu w 5% wodnej dyspersji lecytyny sojowej przekracza 100 mg/100 ml, a roztwór jest trwały przez co najmniej 24 h.
5. Wyniki badań mikroskopowych dowodzą, że analiza wielkości cząstek w dyspersji lecytyny z zastosowaniem dyfrakcji laserowej może być wiarygodna tylko w zakresie wielkości cząstek do ok. 10 μm .
6. Przeprowadzone badania *in vivo* na królikach wskazują na dobrą tolerancję nowego preparatu w postaci roztworu paklitakselu w wodnej dyspersji lecytyny i dowodzą możliwych różnic w farmakokinetyce paklitakselu podawanego dożylnie w tej formie i w formie roztworu solubilizowanego Cremophorem (Taxol). Badania wykonane na myszach dowodzą bezpieczeństwa stosowania drogą pozajelitową wodnych dyspersji lecytyny i zbliżonej lub nawet mniejszej toksyczności paklitakselu w nowym nośniku, w porównaniu z preparatem Taxol.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Rowinsky E.K., Donehower R.C.: Paclitaxel (taxol), *N. Engl. J. Med.*, 1995 (332) 1004-1014
2. Zając M., Pawełczyk E.: *Chemia leków*, AM Poznań 2000
3. Krämer I., Heuser A.: Paclitaxel - pharmaceutical and pharmacological issues, *Environ. Health Perspect.* 1995 (1) 37-41
4. Abraham D.J.: *Burger's Medicinal & Chemistry Drug Discovery*, Wiley-Interscience, New York 2003
5. Nuijen B., Bouma M., Schellens J.M.M., Beijnen J.H.: Progress in the development of alternative pharmaceutical formulations for taxanes, *Invest. New Drugs* 2001 (19) 143-153
6. Appendino G.: Taxol (paclitaxel): historical and ecological aspects, *Fitoterapia* 1993 (1) 5-24
7. Singla A.K., Garg A., Aggarwal D.: Paclitaxel and its formulations, *Int. J. Pharm.* 2002 (235) 179-192
8. Serwis internetowy I-Lab Service
9. Adama J.D., Flora K.P., Goldspiel B.R., Wilson J.W., Arbusk S.G., Finley R.: Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1993 (15) 141-147
10. Pronk L., Stoter G., Verweij J.: Docetaxel (Taxotere): single agent activity, development of combination treatment and reducing side effects, *Cancer Treat. Rev.* 1995 (21) 463-478
11. Spencer C.M., Faulds D.: Paclitaxel: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer, *Drugs* 1994 (48) 794-847
12. Offermanns S., Rosenthal W.: *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin 2004
13. Horwitz S.B., Cohen D., Rao S., Ringel I., Shen H.-J., Yang C.-P.H.: Taxol: mechanism of action and resistance, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1993 (15) 55-61
14. Marsh S.: Taxane pharmacogenetics, *Future Med.* 2006 (3) 33-43
15. Charakterystyka produktu leczniczego Taxol (Bristol-Myers Squibb)
16. *Physicians' Desk Reference*, wyd. 56, Medical Economics - Thomas Healthcare, Montvale 2002
17. *Drug Information for the Health Care Professionals - USP DI*, wyd. 21, Micromedex Thomson Healthcare, Englewood 2001
18. Koda-Kimble M.A., Yee Young L., Kradjan W.A., Guglielmo B.J., Alldredge B.K., Corelli R.L.: *Applied Therapeutics - the Clinical Use of Drugs*, wyd. 8, Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Company, Philadelphia 2003
19. Crown J., O'Leary M.: The Taxane: an update, *Lancet* 2000 (355) 1176-1178

20. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004
21. Hardman J. G., Limbird L. E., Gilman A.: *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, New York 2001
22. Berenson A.: Hope, \$ 4,200 a dose, *The New York Times*, 1. October 2006
23. Urzędowy Wykaz Produktów Leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej: Produkty lecznicze wpisane do rejestru produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terytorium RP, Stan na 31 lipca 2006, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2006
24. *Rote Liste*, Editio Cantor Verlag, Aulendorf 2002
25. Martindale. *The Complete Drug Reference*, wyd. 34, Pharmaceutical Press, London 2005
26. Internet - Orange Book - www.accessdata.fda.gov
27. Trissel L.A.: *Handbook on Injectable Drugs*, wyd. 12, American Society of Health System Pharmacists, Bethesda 2003
28. Weiss R.B., Donehower R.C., Wiernik P.H., Ohnuma T., Gralla R.J., Trump D.L., Baker J.R., Van Echo D.A., Von Hoff D.D., Leyland-Jones B.: Hypersensitivity reactions from Taxol, *J. Clinic. Oncol.* 1990 (8) 1263-1268
29. Ammon H. P. T.: *Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen, ein Handbuch und Tabellenwerk für Ärzte und Apotheker*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2001
30. Van Zuylen L., Verweij J., Sparreboom A.: Role of formulation vehicle in taxane pharmacology, *Invest. New Drugs* 2001 (19) 125-141
31. Desai N., Trien V., Yao Z., Louie L. Ci S., Yang A.: Increased antitumor activity, intratumoral paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of Cremophor-free albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with Cremophor-based paclitaxel, *Clin. Cancer Res.* 2006 (12) 1317-1324
32. Internet - www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm
33. Gelderblom H., Verweij J., Nooter K., Sparreboom A.: Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer* 2001 (37) 1590-1598
34. Tije A. J., Verweij J., Loos W., Sparreboom A.: Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy, *Clin. Pharmacokinet.* 2003 (42) 665-685
35. Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P.J.: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, New York 2003
36. Kibbe A.H.: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, London 2000

37. Zhang J. A., Anyarambhatla G., Ma L., Ugwu S., Xuan T., Sardone T., Ahmad J.: Development and characterization of a novel Cremophor EL-free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005 (59) 177-187
38. Kim T.-Y., Kim D.-W., Chung I.-Y.: Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies, *Clin. Cancer Res.* 2004 (10) 3708-3716
39. Shimomura T., Fujikawa H., Ikawa S., Kigawa J., Terakawa N.: Effects of Taxol on blood cells, *Lancet* 1995 (352) 541-542
40. Kang B.K., Chon S.K., Kim S.H., Jeong S.Y., Kim M.S., Cho S.H., Lee H.B., Khang G.: Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo, *Int. J. Pharm.* 2004 (286) 147-156
41. Hennenfent K. L., Govidan R.: Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?, *Ann. Oncol.* 2006 (17) 735-749
42. Internet - www.macromed.com - OncoGel, paclitaxel, injectable depot - product overview
43. Zentner G.M., Rathi R., Shih C., McRea J.C., Seo M.H., Oh H., Rhee B.G., Mestecky J., Moldoveanu Z., Morgan M., Weitman S.: Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs, *J. Control. Release* 2001 (72) 203-215
44. Internet - www.clinicaltrials.gov
45. Ibrahim N. K., Desai N., Legha S.: Phase I and pharmacokinetic study of ABL-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel, *Clin. Cancer Res.* 2002 (8) 1038-1044
46. Gradishar W. J., Tjulandin S., Davidson N.: Superior efficacy of albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with polyethylated castor-oil-based paclitaxel in women with metastatic breast cancer: results of phase III trial, *J. Clin. Oncol.* 2005 (23) 7794-7803
47. Internet - www.abraxane.com - prescribing informations
48. Wolff A. C., Donehower R. C., Carducci M. K.: Phase I study of docosahexaenoic acid-paclitaxel: a taxane-fatty acid conjugate with a unique pharmacology and toxicity profile, *Clin. Cancer Res.* 2003 (9) 3589-3597
49. Bradley M. O., Webb A. C., Anthony F. H.: Tumor targeting by covalent conjugation of natural fatty acid to paclitaxel, *Clin. Cancer Res.* 2001 (7) 3229-3238
50. Li C.: Poly(L-glutamic acid): anticancer drug conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002 (54) 695-713
51. Sabbatini P., Aghajanian C., Dizon D.: Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 2004 (22) 4523-4531

52. Plummer R., Ghielmini M., Calvert P.: Phase I and pharmacokinetic study of the new taxane analog BMS-184476 given weekly in patients with advanced malignancies, *Clin. Cancer Res.* 2002 (8) 2788-2797
53. Bilenker J. H., Stevenson J. P., Gallagher M. L.: Phase I trial of the novel taxane BMS-184476 administered in combination with carboplatin every 21 days, *Br. J. Cancer* 2004 (91) 213-218
54. Sessa C., Cuvier C., Caldiera S.: Phase I and pharmacokinetic study of a taxoid derivative RPR 109881A administered as a 1-hour or a 3-hour infusion in patients with advanced solid tumors, *Ann. Oncol.* 2002 (13) 1140-1150
55. Rose W.C., Long B.H., Fairchild C.R., Lee F.Y.F., Kadow J.F.: Preclinical pharmacology of BMS-275183, an orally active taxane, *Clin. Cancer Res.* 2001 (7) 2016-2021
56. Polizzi D., Pratesi G., Monestrioli S.: Oral efficacy and bioavailability of a novel taxane, *Clin. Cancer Res.* 2000 (6) 2070-2074
57. Li K. W., Wenbin D., Tyler B. M.: Polylactofate microspheres for paclitaxel delivery to central nervous system malignancies, *Clin. Cancer Res.* 2003 (9) 3441-3447
58. Harper E., Dang W., Lapidus R.G., Garver R.I.: Enhanced efficacy of a novel controlled release paclitaxel formulation (PACLIMER delivery system) for local-regional therapy of lung cancer tumor nodules in mice, *Clin. Cancer Res.* 1999 (5) 4242-4248
59. Hanauske A.-R., Goedhals L., Gelderblom H., Lee Y., Awada A., Vermorken J.B., Bolling C., Ruiz-Garcia A., Pratt J., Stewart M.B.: 1473 POSTER Tocosol®paclitaxel and Cremophor EL-paclitaxel - the pharmacokinetic comparison shows that a new paclitaxel formulation leads to increased drug exposure, *EJC Suppl.* 2005 (3) 427
60. Akers M. J.: Excipient-drug interactions in parenteral formulations, *J. Pharm. Sci.* 2002 (91) 2283-2300
61. Strickley R. G.: Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Pharm. Res.* 2004 (21) 201-230
62. Xiang T.-X., Anderson B. D.: Stable supersaturated aqueous solutions of silatecan 7-t-butyltrimethylsilyl-10-hydroxycamptothecin via chemical conversion in the presence of a chemically modified β -cyclodextrin, *Pharm. Res.* 2002 (19) 1215-1222
63. Yalkowsky S. H., Krzyzaniak J. F., Ward G. H.: Formulation-related problems associated with intravenous drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 1998 (87) 787-796
64. Medlicott N. J., Foster K. A., Audus K. L., Gupta S., Stella V. J.: Comparison of the effects of potential parenteral vehicles for poorly water soluble anticancer drugs (organic cosolvents and cyclodextrin solutions) on cultured endothelial cells (HUV-EC), *J. Pharm. Sci.* 1998 (87) 1138-1143
65. Krzyzaniak J. F., Raymond D. M., Yalkowsky S. H.: Lysis of human red blood cells 2: effect of contact time on cosolvent induced hemolysis, *Int. J. Pharm.* 1997 (152) 193-200
66. Swarbrick J.: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York 2002

67. Lee Y.-C., Zocharski P. D., Samas B.: An intravenous formulation decision tree for discovery compound formulation development, *Int. J. Pharm.* 2003 (253) 111-119
68. Internet - www.rxlist.com
69. Sosada M., Ryszka F.: Lecytyny roślinne - charakterystyka lecytyny farmaceutycznej, *Farm. Pol.* 1991 (47) 739-745
70. USP 30/NF 25, United States Pharmacopeial Convention, Rockville 2007
71. Lecithins and Phospholipids Product Catalogue, Lipoid, Ludwigshafen 2004
72. Sosada M.: Zastosowanie naturalnych i modyfikowanych chemicznie lecytyn oraz syntetycznych fosfolipidów w farmacji, *Farm. Pol.* 2003 (11) 492-500
73. Michajlik A., Bartnikowska E.: Lipidy i lipoproteiny osocza, PZWL, Warszawa 1999
74. Gunstone F.D., Harwood J.L.: *The Lipid Handbook*, Chapman and Hall, New York 1986
75. Minorska A., Szczecińska A.: Pochodne lecytyny rzepakowej otrzymane z ubocznych produktów rafinacji oleju, *Przem. Chem.* 1988 (67) 419-422
76. Ciszewska-Jędrasik M., Pertkiewicz M.: *Mieszaniny do żywienia pozajelitowego: standardy postępowania i zalecenia dla farmaceutów*, PZWL, Warszawa 2004
77. Li J., Caldwell K.D.: Structural studies of commercial fat emulsions used in parenteral nutrition, *J. Pharm. Sci.* 1994 (83) 1586-1592
78. Müller R.H., Hildebrand G.E.: *Technologia nowoczesnych postaci leków*, PZWL, Warszawa 1998
79. Law S.L. Hung H.Y.: Properties of acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. *Int. J. Pharm.* 1998 (161) 253-259
80. New R.C.: *Liposomes: a Practical Approach*, IRL Press, Oxford 1997
81. Internet - www.alza.com
82. Internet - www.ambisome.com
83. Hildebrand A.: Physikochemische charakterisierung von Gallensalz-Mischmizellen als Grundlage für innovative Arzneistoffträgersysteme, rozprawa doktorska, Uniwersytet Marcina Lutra, Halle 2002
84. Patel S.S.: Liposome: A versatile platform for targeted delivery of drugs, www.pharmainfo.net 2006
85. Dąbrowska E.A., Sznitowska M.: Mieszane micelle - nowa postać leku tworzona z udziałem fosfolipidów, *Farm. Pol.* 2003 (59) 839-845
86. Hammad M.A., Müller B.W.: Increasing drug solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 1998 (46) 361-367

87. Hammad M.A., Müller B.W.: Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles, *Eur. J. Pharm.* 1998 (7) 49-55
88. Internet - www.skyepharma.com
89. Rios M.: Gig gain for controlling pain, *Pharm. Technol.* 2004 (10) 55-60
90. Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1976 (72) 1525-1568
91. Fattal D., Andelman D., Ben-Shaul A.: The vesicle-micelle transition in mixed lipid-surfactant systems: a molecular model, *Langmuir* 1995 (11) 1154-1161
92. Dołowy K., Szewczyk A., Piśkuła S.: *Błony biologiczne*, Śląsk, Warszawa 2003
93. Koynova R., Caffrey M.: Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta* 1998 (1376) 91-14
94. Bihan T., Pezolet M.: Study of the structure and phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine by infrared spectroscopy: characterization of the pretransition and subtransition, *Chem. Phys. Lipids* 1998 (94) 13-33
95. Garbuzenko O., Barenholz Y., Priev A.: Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer, *Chem. Phys. Lipids* 2005 (135) 117-129
96. Krzaczkowska J., Szczesniak E., Jurga S.: Phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine/surfactant/water systems studied by infrared spectroscopy, *J. Mol. Struct.* 2006 (794) 168-172
97. Brandenburg K., Garidel P., Howe J., Andra J., Hawkins L., Koch M.H.J., Seydel U.: What can calorimetry tell us about changes of three-dimensional aggregate structures of phospholipids and glycolipids, *Thermochim. Acta* 2006 (445) 133-143
98. Janicki, S., Sznitowska, M., Karas, W., Mroczek, Z., Tyrała, A., Czarnecka, I.: Method for the production of a stable pharmaceutical form of paclitaxel, *Eur. Patent* 1363892 B1, 2006
99. Dąbrowska E.A.: Porównanie właściwości wodnych dyspersji lecytyny (WDL) oraz emulsji submikronowych jako nośników substancji leczniczych, rozprawa doktorska, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej AMG, Gdańsk 2003
100. Lunn G., Schmuff N.: *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*, John Wiley & Sons, New York 1997
101. Knorr F., Wenzel U. D.: *Choroby królików*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1988
102. Gibasiewicz W.: *Choroby królików*, PWN, Warszawa 1989
103. Narain P.K., DeMaria E.J., Heuman D.M.: Lecithin protects against plasma membrane disruption by bile salts, *J. Surg. Res.* 1998 (78) 131-136

104. Yu B.G., Okano T., Kataoka K., Kwon G.: Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B, *J. Control. Release* 1998 (53) 131-136
105. Sznitowska M., Dabrowska E., Janicki S.: Solubilizing potential of submicron emulsions and aqueous dispersions of lecithin, *Int. J. Pharm.* 2002 (246) 203-206
106. Dürr M., Hager J., Löhr J.P.: Investigation on mixed micelle and liposome preparations for parenteral use based on soya phosphatidylcholine, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1994 (40) 147-156
107. Alkan-Onyuksel H., Ramakrishnan S., Chai N.B., Pezzuto J.M.: A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of Taxol, *Pharm. Res.* 1994 (11) 206-212
108. Manconi M., Aparicio J., Vila A.O., Pendás J., Figueruelo J., Molina F.: Viscoelastic properties of concentrated dispersions in water of soy lecithin, *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects* 2003 (222) 141-145
109. Gregoriadis G.: *Liposomes as drug carriers: recent trends and progress*, John Wiley, New York 1988
110. Sinswat, P., Gao X., Yacaman M., Williams III R.O., Johnston K.P.: Stabilizer choice for rapid dissolving high potency itraconazole particles formed by evaporative precipitation into aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 2005 (302) 113-124
111. Karta charakterystyki substancji - deoksycholan sodu (Sigma-Aldrich)
112. Kan P., Chen Z.B., Lee C.-J., Chu I.-M.: Development of nonionic surfactant / phospholipid / o / w emulsion as a paclitaxel delivery system, *J. Control. Release* 1999 (58) 271-278
113. Tustian A., Kessler D.R., Constantinides P.P.: Tocol emulsions for drug and solubilization and parenteral delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004 (56) 1243-1255
114. Han J., Davies S.S., Papandreou C., Melia C.D., Washington C.: Design and evaluation of an emulsion vehicle for paclitaxel. I. Physicochemical properties and plasma stability, *Pharm. Res.* 2004 (21) 1573-1580
115. Fan T., Takayama K., Hattori Y., Maitani Y.: Formulation optimization of paclitaxel carrier by pegylated emulsions based on artificial neural network, *Pharm. Res.* 2004 (21) 1692-1697
116. Krishnadas K., Rubinstein I., Onyuksel H.: Sterically stabilized phospholipid mixed micelles: in vitro evaluation as a novel carrier for water-insoluble drugs, *Pharm. Res.* 2003 (20) 297-302
117. Fetterly G.J., Straubinger R.M.: Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats, *AAPS Pharm. Sci.* 2003 (5)
118. Lee J., Lee S.C., Acharya G., Chang C., Park K.: Hydrotropic solubilization of paclitaxel: analysis of chemical structures for hydrotropic property, *Pharm. Res.* 2003 (20) 1022-1030

119. Chen H, Zhang Z., McNulty C.: A high-throughput combinatorial approach for the discovery of a Cremophor EL-free paclitaxel formulation, *Pharm. Res.* 2003 (20) 1302-1308
120. Tarr B.D., Yalkowsky S.H.: A new parenteral vehicle for the administration of some poorly soluble anti-cancer drugs, *J. Parenter. Sci. Technol.* 1987 (41) 31
121. Lesic D.: *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam 1993
122. Polozova A.I., Dubachev G.E., Simonova T.N., Barsukov L.: Temperature-induced micellar-lamellar transformation in binary mixtures of saturated phosphatidylcholines with sodium cholate, *FEBS Lett.* 1995 (358) 17-22
123. Stoye I., Schröder K., Müller-Goymann C.: Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles - physicochemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998 (46) 191-100
124. Edwards K., Gustafsson J., Almegren M., Karlsson G.: Solubilization of lecithin vesicles by a cationic surfactant observed by cryo-transmission electron microscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 1993 (161) 299-309
125. Gołucki Z., Barański A.: Współczesny pogląd na trwałość lipidów stosowanych w farmacji, *Farm. Pol.* 1979 (35) 65-71
126. Huang Y.-Y., Chung T.-W., Wu Ch.-I.: Effect of saturated/unsaturated phosphatidylcholine ratio on the stability of liposome-encapsulated hemoglobin, *Int. J. Pharm.* 1998 (172) 161-167
127. Rabinovich-Guilatt L., Dubernet C., Gaudin K.: Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical parameters and a new analytical method, *Eur. J. Pharm.* 2005 (61) 69-76
128. He L., Wang G., Zhang Q.: An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile, *Int. J. Pharm.* 2003 (250) 45-50
129. Sharma A., Sharma U.S., Straubinger R.M.: Paclitaxel-liposomes for intracavitary therapy of intraperitoneal P388 leukemia, *Cancer Lett.* 1996 (107) 265-272

VIII. ZAŁĄCZNIKI

Lipoid

ANALYTICAL DATA

Product: LIPOID E 80

Merck Sp.z.o.o.

Date of production: 06/2004

rec. storage temp.: $\leq -18^{\circ}\text{C}$

Expiry date: 06/2007

Delivery: 17.08.2004

Quantity: 1.0 kg

Lot No.: 1031233-12

	<u>Specification</u>	<u>Result</u>	<u>Method</u>
Phosphatidyl choline (+ LPC)	80.0 - 85.0 %	84.0 %	PC2
Phosphatidyl ethanolamine	7.0 - 9.5 %	8.0 %	DE-PE
Lysophosphatidyl choline	n.m.t. 3.0 %	2.2 %	ADC3
Lysophosphatidyl ethanolamine	n.m.t. 0.5 %	0.4 %	ADC3
Sphingomyelin	2.0 - 3.0 %	2.2 %	ADC3
Phosphorus	3.7 - 4.0 %	3.8 %	TP
Triglycerides	n.m.t. 3.0 %	2.2 %	ADC5
Cholesterol	n.m.t. 1.5 %	0.7 %	ADC5
Free fatty acids	n.m.t. 0.05 %	1.t.0.05 %	ADC5
DL-a-Tocopherol	0.05 - 0.1 %	0.06 %	TO
Water (KF)	n.m.t. 2.0 %	0.5 %	USP <921>Ia
Ethanol	n.m.t. 0.2 %	< 0.2 %	ET
Acid value	7 - 10	8.3	SZ
Peroxide value	n.m.t. 3	0	POZ
Iodine value	65 - 69	67	JZ

Lipoid

ANALYTICAL DATA

-2-

Product: LIPOID E 80 Merck Sp.z.o.o.

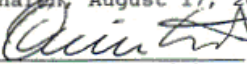
Lot No.: 1031233-12

	<u>Specification</u>	<u>Result</u>	<u>Method</u>
Consistency	agglomerates	agglomerates	
Colour	yellow	yellow	
Heavy metals	n.m.t. 10 ppm	< 10 ppm	USP <231>II
Endotoxins (LAL-Test)	n.m.t. 6 EU/g	< 0.7 EU/g	EU
Aflatoxin B ₁	n.m.t. 2 ppb	< 2 ppb	AFL
Aflatoxins B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	n.m.t. 4 ppb	< 4 ppb	AFL

Bacteriological account n.d.* = not detected, limit < 10 C.F.U. / g

C.F.U.	/ g	n.m.t. 100	n.d.*	USP <61>
E.Coli	/ 10 g	neg.	neg.	
Salmonellae	/ 10 g	neg.	neg.	
Moulds	/ g	n.m.t. 10	n.d.*	
Staphyloc. au.	/ 10 g	neg.	neg.	
Pseudom. aerug.	/ 10 g	neg.	neg.	

D-67065 Ludwigshafen, August 17, 2004


Dr. R.-O. Quinkert
Quality Control


Dr. Dirk Bruns
Quality Control

Lipoid

ANALYTICAL DATA

Product: LIPOID S 100

Medical University of Gdansk
 Dept. Pharm. Technology
 Dept. of Pharmacy
 Ms. Małgorzata Klunder
 Date of production: 06/2003
 rec. storage temp.: $\leq -18^{\circ}\text{C}$
 Delivery: 28.10.2003

Lot No.: 790431-6

Sample-Quantity: 50 g

	Specification	Result	Method
Phosphatidyl choline (based on dry weight)	n.l.t. 94.0 %	95.6 %	PC2
Phosphatidyl ethanolamine	n.m.t. 0.1 %	1.t.0.1 %	ADC3
Lysophosphatidylcholine	n.m.t. 3.0 %	0.8 %	ADC3
Phosphatidyl-inositol	n.m.t. 0.1 %	1.t.0.1 %	ADC3
N-Acyl-phosphatidyl- ethanolamine	n.m.t. 0.5 %	1.t.0.1 %	ADC3
Phosphorus	3.7 - 4.0 %	3.93 %	TP
Nonpolar lipids	n.m.t. 3.0 %	2.8 %	LG1
Triglycerides	n.m.t. 2.0 %	0.8 %	ADC5
Dl- α -Tocopherol	0.15 - 0.25%	0.19 %	ADC5
Water (KF)	n.m.t. 2.0 %	0.7 %	USP <921>Ia
Ethanol	n.m.t. 0.2 %	1.t.0.2 %	ET
Peroxide value	n.m.t. 3	0	POZ
Iodine value	97 - 107	107	JZ
Consistency	agglomerates	agglomerates	
Color of a solution of 0,2 g/10 ml Ethanol	n.m.t. Y 2	1.t.Y 2	Ph.Eur. 2.2.2

-2-

Lipoid

ANALYTICAL DATA

-2-

Product: LIPOID S 100 Medical University of Gdansk

Lot No.: 790431-6

	<u>Specification</u>	<u>Result</u>	<u>Method</u>
Heavy metals	n.m.t. 10 ppm	l.t. 10 ppm	USP <231>II
Endotoxines (LAL-test)	n.m.t. 6 EU / g	l.t. 0.7 EU / g	EU

Bacteriological account n.d.* = not detected, limit < 10 C.F.U. / g

C.F.U.	/ g	n.m.t. 100	n.d.*	USP<61>
E.coli	/ 10 g	neg.	neg.	
Salmonellae	/ 10 g	neg.	neg.	
Moulds	/ g	n.m.t. 10	n.d.*	
Staphylococcus aur.	/ 10 g	neg.	neg.	
Pseudomonas aerug.	/ 10 g	neg.	neg.	

D-67065 Ludwigshafen, October 29, 2003



Dr. Dirk Bruns
Quality Control



Dr. Andrea Reith
Quality Control

LIPOID GMBH · FRIGENSTRASSE 4 · D-67065 LUDWIGSHAFEN · TELEFON 0621-5 38 19-0 · TELEFAX 0621-55 35 59