

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 248770 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **446816**

(22) Data zgłoszenia: **2023.11.23**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2025.05.26 BUP 21/2025**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.01.26 WUP 04/2026**

(51) MKP:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/133 (2006.01)

A61K 47/18 (2017.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

A61K 8/14 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

URSZULA BAZYLIŃSKA, Wrocław, PL

EWELINA WAGLEWSKA,

Skarżysko-Kamienna, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Bilosomy o dodatnim ładunku i sposób ich wytwarzania

PL 248770 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowej generacji bilosomy o dodatnim ładunku oraz sposób ich wytwarzania, przeznaczone do stosowania w przemyśle medycznym, farmaceutycznym i kosmetycznym jako nanoonośniki substancji aktywnych biologicznie o różnej rozpuszczalności.

Bilosomy to zamknięte układy pęcherzykowe zbudowane z niejonowego środka powierzchniowo czynnego, przypominające niosomy (modyfikowane liposomy), ale zawierające dodatkowo w swojej strukturze sole kwasów żółciowych (m.in. cholan sodu, deoksycholan sodu czy taurocholan sodu). Wprowadzenie soli kwasów żółciowych do otoczki lipidowej pęcherzyków prowadzi do zwiększenia zarówno ich stabilności, jak i odkształcalności, zapewniając tym samym wyższą ochronę przed enzymatyczną degradacją w przewodzie pokarmowym. Powyższe związki zaliczane do biosurfaktantów, oprócz funkcji stabilizującej, mają również korzystny wpływ na działanie fluidyzujące w transdermalnym dostarczaniu tych układów do miejsca docelowego. Chociaż bilosomy zostały początkowo opracowane do aplikacji szczepionek drogą doustną, to właśnie dzięki swoim unikatowym właściwościom użytkowym (tj. nanoskopowy rozmiar, wysoka stabilność kinetyczna, biokompatybilność czy wysoka elastyczność), są coraz częściej wykorzystywane w badaniach nad podawaniem substancji aktywnych do oka [A. M. Mohsen et al., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 59 (2020) 101910], donosowo [M. M. El Taweel et al., *Pharmaceutics* 13 (2021) 1828], podpoliczkowo [M. F. Aldawsari et al., *Polymers* 14 (2022) 4184], a także miejscowo/przezskórnio [H. F. Salem et al., *Int. J. Nanomedicine* 17 (2022) 1185].

Projektowanie wysoce biokompatybilnych nanoonośników o ukierunkowanym zastosowaniu można osiągnąć poprzez dobór odpowiednich składników budulcowych. Do tej pory do opracowywania bilosomów wykorzystywano przede wszystkim niejonowe surfaktanty syntetyczne z grupy estrów sorbitanu i ich oksyetylenowanych pochodnych, dostępnych na rynku pod handlową nazwą Span® oraz Tween®. Te związki powierzchniowo czynne charakteryzują się jednak niską biodegradowalnością, wysoką wrażliwością na czynniki środowiskowe (pH temperatura), a także mogą prowadzić do występowania wszelkiego rodzaju podrażnień i uczuleń. Powyższe właściwości mogą zatem ograniczać zastosowanie klasycznych bilosomów w aplikacjach biologicznych i dlatego, aby usprawnić biokompatybilność tych nanostruktur, należy wykorzystywać głównie wysoce biodegradowalne i nietoksyczne fosfolipidy. Niestety pomimo wysokiej biodegradowalności i biokompatybilności tych biosurfaktantów jednym z ograniczeń stosowania zarówno fosfolipidów, jak i soli kwasów żółciowych jest nadawanie opracowywanej strukturze wysoce ujemnego ładunku. A zatem, w celu osiągnięcia maksymalnego efektu terapeutycznego (szczególnie w przypadku transdermalnego podawania substancji aktywnych), istotna jest również inkorporacja lipidu kationowego o dobrze udokumentowanym profilu bezpieczeństwa w licznych badaniach klinicznych, który nada opracowywanemu układowi ładunek dodatni. Dodatkowa funkcjonalizacja za pomocą lipidu kationowego może usprawnić nanostrukturze oddziaływanie ze skórą, która działa jak ujemnie naładowana membrana ze względu na obecność dużej ilości ujemnie naładowanych lipidów w warstwie rogowej naskórka. Natomiast w przypadku terapii przeciwnowotworowych, włączenie lipidu kationowego do struktury nanoonośnika pozwala na poprawę jego oddziaływań z nowo tworzonymi ujemnie naładowanymi komórkami śródbłonka, które są niezbędne do wzrostu naczyń krwionośnych guza. Jest to możliwe dzięki niespecyficznym interakcjom elektrostatycznym tych lipidów z anionowymi grupami siarczanowymi proteoglikanów na powierzchni komórek nowotworowych [K. K. Ewert et al., *Pharmaceutics* 13 (2021) 1365].

W literaturze naukowej i patentowej pojawiają się jedynie nieliczne doniesienia na temat zwiększenia biokompatybilności i skuteczności działania nośników bilosomalnych poprzez wbudowywanie w ich strukturę naturalnych fosfolipidów oraz lipidów nadających otoczce pęcherzyka ładunek dodatni. W znacznym stopniu, prowadzone badania opierają się na syntezie bilosomów o ładunku ujemnym z wykorzystaniem surfaktantów pochodzenia syntetycznego, co zostało opisane w artykułach naukowych podanych poniżej.

W artykule naukowym El-Sayed Khafagy et al., w *Polymers* 15 (2023) 677, opisano bilosomy zbudowane z fosfatydylocholinoi pozyskiwanej z nasion soi, cholesterolu, monostearynianu sorbitanu (Span®60) oraz deoksycholano sodu (sól sodowa kwasu deoksycholowego), wytwarzane za pomocą techniki hydratacji cienkiego filmu lipidowego, a następnie wspomaganą ultradźwiękami (proces sonifikacji – 3 cykle po 3 min., pomiędzy poszczególnymi cyklami 5-minutowe przerwy). Opracowany przez autorów układ bilosomalny został skutecznie wykorzystany do transdermalnego dostarczania leku o działaniu przeciwzapalnym (simwastatyny), co pozwoliło zarówno na zwiększenie zdolności przenikania związku aktywnego przez skórę, jak i jego ogólnoustrojowej biodostępności.

Z pracy A. Ismail et al., w *AAPS PharmSciTech* 23 (2022) 188 znane są bilosomy stabilizowane deoksycholem sodu i cholesterolem, a także zawierające w swojej strukturze monostearynian sorbitanu (Span®60) jako surfaktant niejonowy. W badaniach z powodzeniem wykorzystano metodę hydratacji cienkiego filmu lipidowego, a następnie sonifikacji do opracowania stabilnego układu bilosomalnego, docelowo przeznaczonego do doustnego podawania leku przeciwdepresyjnego – chlorowodoru sertraliny (selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny). Autorzy wykazali zarówno wyższą biodostępność, jak i skuteczność przenikania przez błonę jelitową enkapsulowanego leku w porównaniu do jego formy natywnej niezwiązanej z nośnikiem.

Z kolei publikacja N. K. Alruwaili et al., w *Drug Delivery* 29 (2022) 3035 opisuje bilosomy modyfikowane powierzchniowo do doustnego dostarczania kwercetyny, opracowane przy użyciu metody odparowania rozpuszczalnika. Autorzy otrzymali nanoosiłki polimerowe na bazie chitozanu o wysokim stopniu enkapsulacji związku aktywnego, których otoczka składa się z monostearynianu sorbitanu (Span®60), cholesterolu i deoksycholemu sodu.

Stabilizację niejonowym monostearynianem sorbitanu (Span®60) zastosowali również badacze z grupy H.F. Salem et al., w *Int. J. Nanomedicine* 17 (2022) 1185. Do opracowania bilosomów o ujemnym ładunku, wytwarzanych metodą odparowania rozpuszczalnika, wykorzystano ponadto deoksycholem sodu jako sól kwasu żółciowego oraz cholesterol. Autorzy wykorzystali zoptymalizowany układ bilosomalny jako miejscowy system dostarczania chlorowodoru metforminy, który pozwolił zwiększyć jego przenikanie przez skórę, a tym samym ograniczyć występowanie ciężkiego zapalenia błony śluzowej żołądka jako głównego efektu ubocznego przy doustnym podawaniu tego leku.

Z pracy R. Binsuwaidan et al., w *Pharmaceuticals* 15 (2022) 1043 znane są bilosomy do doustnego dostarczania likopenu, w których otoczka jest zbudowana z cholenu sodu (sól sodowa kwasu cholowego), cholesterolu oraz monostearynianu sorbitanu (Span®60). Autorzy artykułu otrzymali układy nanopęcherzykowe, które mogą wykazywać skuteczną aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wielolekoopornego izolatu *K. pneumoniae*, jak również zmniejszyć stan zapalny i przekrwienie w tkankach płuc myszy, znacznie zmniejszając zwłóknienie płuc.

W pracy S. Mosallam et al., w *AAPS PharmSciTech* 22 (2021) 74 do opracowania wysoce odkształcalnych nanoosiłków, oprócz tradycyjnych składników (Span®60, cholesterol, deoksycholem sodu), wykorzystano dodatkowy surfaktant niejonowy – Brij®93 (eter oleilowy glikolu polietylenowego). Bilosomy, które zostały wykorzystane do miejscowego dostarczania leku przeciwgrzybiczego (terkonazolu), otrzymano metodą wstrzykiwania roztworu etanolowego, w połączeniu z techniką sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej. Autorzy ujawnili skuteczne działanie zoptymalizowanego układu w stosunku do wybranego szczepu *Candida* (tj. *C. albicans*).

Z artykułu naukowego A.M. Al-Mahallawi et al., w *Int. J. Pharm.* 485 (2015) 329 znane są bilosomy również przygotowane metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego, a następnie sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej, których otoczka składa się z monostearynianu sorbitanu (Span®60), cholesterolu i deoksycholemu sodu. Autorzy skutecznie wykorzystali opracowany nanoosiłki do transdermalnego dostarczania niesteroidowego leku przeciwzapalnego (tenoksykamu).

W literaturze patentowej można spotkać wyłącznie chińskie zgłoszenie patentowe nr CN115226898A, w którym opisane są bilosomy zbudowane z lecytyny, monooleinianu polioksyetylenosorbitanu (Tween®80) i deoksycholemu sodu, opracowane w oparciu o metodę hydratacji cienkiego filmu lipidowego połączoną z techniką sonifikacji. Otrzymany system nośnikowy posłużył do poprawienia biodostępności i przedłużonego uwalniania pigmentu karotenoidowego w jelicie cienkim.

W literaturze naukowej można również znaleźć kilka prac, w których do opracowywania bilosomów wykorzystuje się naturalne fosfolipidy zamiast powszechnie stosowanych syntetycznych środków powierzchniowo czynnych.

Z pracy M. Zewail et al., w *Pharmaceuticals* 16 (2023) 36 znane są bilosomy, których otoczka składa się z fosfatydylocholiny pozyskiwanej z nasion soi (Lipoid S100), cholesterolu i deoksycholemu sodu, wytworzone metodą hydratacji cienkiego filmu lipidowego w połączeniu z sonifikacją w łaźni ultradźwiękowej. Autorzy wykazali, że opracowany układ bilosomalny może efektywnie dostarczać naturalny składnik bioaktywny (spirulinę), oferując maksymalne efekty terapeutyczne w leczeniu uszkodzeń skóry wywołanych promieniowaniem UV.

W artykule naukowym M. H. Elkomy et al., w *Pharmaceutics* 14 (2022) 563 opisane są bilosomy powlekanie chitozanem do przezskórnego dostarczania alkaloidu pochodzenia roślinnego (berberyny) w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, wytwarzane w oparciu o metodę hydratacji cienkiego

filmu lipidowego połączoną z techniką sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej. Autorzy wykorzystali lecytynę sojową, cholesterol oraz deoksycholan sodu jako składniki budulcowe otoczki bilosomalnej.

Z kolei publikacja S. Ahmed et al., w *Int. J. Nanomedicine* 15 (2020) 9783 opisuje wytwarzanie nośników bilosomalnych przy użyciu fosfatydylocholine pozyskiwanej z nasion soi, deoksycholenu sodu oraz limonenu jako „wzmacniacza przenikania” przez skórę poprzez jego interakcję z lipidami warstwy rogowej naskórka. Nośniki pęcherzykowe zostały opracowane w oparciu o metodę hydratacji cienkiego filmu lipidowego do zwiększenia przezskórnego dostarczania lornoksykamu, należącego do niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

Na szczególną uwagę badawczą w procesie zwiększania biodostępności i wzmocnionego dostarczania związku aktywnego do miejsca docelowego zasługują elastyczne bilosomy, których otoczka lipidowa (oprócz soli kwasów żółciowych) zawiera naturalne związki powierzchniowo czynne – fosfolipidy oraz wybrane lipidy nadające opracowywanej strukturze ładunek dodatni. Taki układ bilosomalny swoim składem nie tylko przypomina strukturę lipidową skóry, ale również pozwala zwiększyć zdolność do interakcji nanonośnika ze skórą, co jest wyjątkowo istotne dla transdermalnego/miejscowego dostarczania substancji aktywnych, co dowiedziono i opisano w poniższych artykułach naukowych.

Z pracy AbuBakr'a et al., w *Int. J. Pharm.*, 635 (2023) 122776 znane są bilosomy o dodatnim ładunku, których otoczka zbudowana jest z fosfatydylocholine pozyskiwanej z nasion soi (Phospholipon®90G), lipidu kationowego – stearyloaminy oraz soli kwasów żółciowych: deoksycholenu sodu i taurocholenu sodu, wytwarzane w oparciu o metodę hydratacji cienkiego filmu lipidowego. Zoptymalizowane układy bilosomalne zostały z powodzeniem wykorzystane do enkapsulacji kortykosteroidu (propionianu flutykazonu) dla przezskórnego leczenia zapalenia stawów. Autorzy udowodnili, że włączenie stearyloaminy oraz soli kwasów żółciowych znacznie zwiększyło transdermalną skuteczność dostarczania ładunku aktywnego w opracowanych bilosomach, co staje się istotną strategią terapeutyczną dla wielu przewlekłych chorób zapalnych, szczególnie zapalenia stawów.

Z kolei publikacja Elnaggar'a et al., w *Int. J. Pharm.*, 564 (2019) 410 opisuje otrzymywanie bilosomów o ładunku dodatnim metodą odparowania faz odwróconych (ang. reverse-phase evaporation, REV) z 3 cyklami ekstruzji (wyłaczania) w celu zmniejszenia rozmiaru nośnika. Układ został zbudowany z fosfatydylocholine pozyskiwanej z nasion soi (LIPOID S 100), z dodatkiem lub bez cholesterolu, trzech różnych soli kwasów żółciowych, tj. tauroglikocholenu sodu, deoksycholenu sodu i taurocholenu sodu oraz lipidu kationowego – stearyloaminy lub chlorku 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu. Zoptymalizowane bilosomy zostały przeznaczone do enkapsulacji pirydynylobisfonianu trzeciej generacji – ryzedronianu dla jego doustnego podawania. Autorzy wykazali wysoką stabilność nośników o ładunku dodatnim w symulowanych warunkach środowiskowych przewodu pokarmowego, jednakże zaobserwowana toksyczność jelitowa może ostatecznie ograniczyć ich zastosowanie w doustnym podawaniu związków aktywnych.

W literaturze przedmiotu nie są znane elastyczne bilosomy o dodatnim ładunku wytwarzane metodami: hydratacji cienkiego filmu lipidowego i sonifikacji, których otoczka składa się z fosfatydylocholine z żółtek jaja kurzego (naturalnego fosfolipidu), cholenu sodu (soli kwasu żółciowego), chlorku 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu (lipidu kationowego) oraz dodatkowo funkcjonalizowanych glikolem polietylenowym przy użyciu 1,2-distearoilo-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000].

Istotą rozwiązania według wynalazku są nowej generacji bilosomy o dodatnim ładunku, złożone z otoczki zawierającej fosfatydylocholinę z żółtek jaja kurzego (PC) o stężeniu od 3,0 do 6,0 mg/ml, chlorek 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) o stężeniu od 4,0 do 7,0 mg/ml oraz hydrat cholenu sodu (SC) o stężeniu 1,0 mg/ml.

Korzystnie do otoczki zawiera dodatkowo 1,2-distearoilo-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) o stężeniu 0,5 mg/ml.

Istotą wynalazku jest również sposób wytwarzania bilosomów o ładunku dodatnim charakteryzujący się tym, że w pierwszej kolejności dokładnie odważone ilości fosfatydylocholine z żółtek jaja kurzego (PC) (9–18 mg), chlorku 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-C1) (12–21 mg) oraz 1,2-distearoilo-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) (0–1,5 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml, a następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej, natomiast równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholenu sodu (SC)

w stężeniu 1 mg/ml, po czym powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadłe magnetycznym w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków i w ostatnim etapie dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków, które przechowuje się w temperaturze 4°C do ich późniejszego wykorzystania.

Korzystnie dodaje się fosfatydylocholinę z żółtek jaja kurzego (PC) w ilości 6 mg/ml, chlorek 1,2-dioleoil-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) w ilości 4 mg/ml oraz 1,2-distearoil-sn-glicero-fosfoetanoloamino-N-[metoksy(glikol polietylenowy) 2000] (DSPE-PEG2000) w ilości 0,5 mg/ml.

Korzystnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się przez 10 min. pod zmniejszonym ciśnieniem za pomocą wyparki rotacyjnej.

Korzystnie po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego do kolbki okrągłodennej dodaje się szklaną kulkę w celu ułatwienia tworzenia się struktur pęcherzykowych z filmu lipidowego podczas procesu jego uwadniania.

Korzystnie mieszaninę poddaje się działaniu ultradźwięków przez okres od 1 do 5 min., w temperaturze pokojowej.

Korzystnie mieszaninę poddaje się działaniu ultradźwięków przez 3 min.

Do charakteryzowania rozmiaru (wyrażonego jako średnica hydrodynamiczna – D_H) i współczynnika polidispersyjności (Pdl) otrzymanych bilosomów stosuje się technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. dynamic light scattering), do wyznaczenia ich potencjału zeta (ζ) wykorzystuje się technikę elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS, ang. electrophoretic light scattering), natomiast do zobrazowania otrzymanych nanostruktur stosuje się mikroskopię sił atomowych (AFM, ang. atomic force microscopy) oraz transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM, ang. transmission electron microscopy).

Zaletą bilosomów o dodatnim ładunku według wynalazku jest wysoka stabilność kinetyczna, sferyczny kształt, rozmiar < 100 nm oraz ich niska polidispersyjność. Kolejną korzyścią jest zdolność do łatwego, efektywnego i jednoczesnego wprowadzenia do wnętrza bilosomów składników aktywnych o różnej rozpuszczalności, tj. hydrofobowych i hydrofilowych cząsteczek, odpowiednio do dwuwarstwy fosfolipidowej i rdzenia wodnego. Układy te mogą stanowić doskonałą formułę bazową dla wielu zastosowań medycznych, kosmetycznych i farmaceutycznych, szczególnie dla transdermalnego/miejscowego dostarczania substancji biologicznie czynnych z uwagi na ich unikatowy rozmiar, który może sprzyjać ich zwiększonej zdolności do przenikania przez zewnętrzną warstwę rogową naskórka (stratum corneum), aż do skóry właściwej.

Zasadnicze korzyści z wynalazku polegają na możliwości wytwarzania bardzo dogodną metodą, bez konieczności stosowania dużych nakładów energii, biodegradowalnych, biokompatybilnych i stabilnych bilosomów o dodatnim ładunku, które mogą tym samym stanowić innowacyjne systemy do kontrolowanego dostarczania związków aktywnych do tkanek zmienionych chorobowo, otrzymanych metodą, w której wykorzystuje się koloidalne procesy samoorganizacji z udziałem amfifilowych biomolekuł.

Przedmiot wynalazku objaśniony jest w przykładach zebranych w Tabeli 1, dotyczących wytwarzania bilosomów nowej generacji zawierających w otocze lipid kationowy (DOTAP-Cl), którego głównym celem jest nadanie projektowanej strukturze ładunku dodatniego oraz na Rysunkach 1–4. W Tabeli 1 zebrano składy dla wszystkich otrzymanych układów bilosomalnych (I–VIII) wraz z wyznaczonymi parametrami fizykochemicznymi (średnica hydrodynamiczna – D_H , współczynnik polidispersyjności – Pdl, potencjał zeta – ζ). Rys. 1 przedstawia odpowiednio obrazy wykonane techniką TEM oraz AFM bilosomów otrzymanych na przykładzie II, jak również rozrzut rozmiarów i potencjału zeta dla tych nanoosników otrzymanych odpowiednio techniką DLS oraz ELS. Rys. 2 oraz Rys. 3 przedstawia odpowiednio wpływ czasu przechowywania rozmiar (D_H) oraz indeks polidispersyjności (Pdl) otrzymanych bilosomów o dodatnim ładunku (dla przykładów I–VIII). Natomiast Rys. 4 przedstawia zmiany potencjału ζ również po 30 dniach przechowywania otrzymanych układów pęcherzykowych (dla przykładów I–VIII). Otrzymane wyniki badań dowodzą wysokiej stabilności koloidalnej otrzymanych bilosomów o dodatnim ładunku, co potwierdza ich korzystne właściwości fizykochemiczne do wykorzystania jako nanoosników substancji biologicznie czynnych będących przedmiotem niniejszego wynalazku.

Przykład I

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholinę z żółtek jaja kurzego (PC) (18 mg) oraz chlorku 1,2-dioleoil-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (12 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa:

80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadło magnetyczne w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanoosników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 75 nm przy współczynniku polidispersyjności (Pdl) równym 0,283. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +72 mV.

Przykład II

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (18 mg), chlorku 1,2-dioleoilu-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (12 mg) oraz 1,2-distearoilu-sn-glicero-fosfoetanolu-amino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) (1,5 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadło magnetyczne w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanoosników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 68 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,289. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +47 mV.

Przykład III

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (15 mg) oraz chlorku 1,2-dioleoilu-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (15 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadło magnetyczne w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanoosników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 108 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,341. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +79 mV.

Przykład IV

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (15 mg), chlorku 1,2-dioleoilu-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (15 mg) oraz 1,2-distearoilu-sn-glicero-fosfoetanolu-amino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) (1,5 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadło magnetyczne w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanoosników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 71 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,309. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +58 mV.

Przykład V

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (12 mg) oraz chlorku 1,2-dioleoilu-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (18 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie

okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadle magnetycznym w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanonośników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 93 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,275. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +76 mV.

Przykład VI

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (12 mg), chlorku 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (18 mg) oraz 1,2-distearoilo-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) (1,5 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadle magnetycznym w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanonośników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 68 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,305. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +53 mV.

Przykład VII

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (9 mg) oraz chlorku 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (21 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadle magnetycznym w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanonośników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 118 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,355. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +78 mV.

Przykład VIII

Dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (9 mg), chlorku 1,2-dioleilo-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-Cl) (21 mg) oraz 1,2-distearoilo-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) (1,5 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml. Następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej (10 minut). Równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml. Powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadle magnetycznym w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków. Na koniec dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej przez około 3 min, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków. Rozmiar nanonośników (wyrażony jako średnica hydrodynamiczna – D_H , wyznaczona techniką DLS) wynosi 94 nm przy współczynnikach polidispersyjności (Pdl) równym 0,226. Natomiast potencjał zeta (ζ) otrzymanego układu, wyznaczony techniką ELS wynosi +60 mV.

Zastrzeżenia patentowe

1. Bilosomy o dodatnim ładunku **znamienne tym**, że otoczka zawiera fosfatydylocholinę z żółtek jaja kurzego (PC), chlorek 1,2-dioleoil-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-C1) oraz hydrat cholanu sodu (SC).
2. Bilosomy według zastrz. 1, **znamienne tym**, że otoczka zawiera 1,2-distearoil-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikol polietylenowy) 2000] (DSPE-PEG2000).
3. Sposób wytwarzania bilosomów o ładunku dodatnim **znamienny tym**, że w pierwszej kolejności dokładnie odważone ilości fosfatydylocholiny z żółtek jaja kurzego (PC) (9–18 mg), chlorku 1,2-dioleoil-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-C1) (12–21 mg) oraz 1,2-distearoil-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (DSPE-PEG2000) (0–1,5 mg) rozpuszcza się w 3 ml chloroformu w kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml, a następnie rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 45°C za pomocą wyparki rotacyjnej (prędkość obrotowa: 80 rpm), aż do uzyskania cienkiej i całkowicie suchej warstwy lipidowej, natomiast równomiernie utworzony na ściankach kolby okrągłodennej suchy film lipidowy uwadnia się kolejno w 3 ml wodnego roztworu zawierającego sól kwasu żółciowego – cholan sodu (SC) w stężeniu 1 mg/ml, po czym powstałą dyspersję miesza się przez 3 godziny na mieszadło magnetycznym w celu wytworzenia heterogenicznej populacji pęcherzyków i w ostatnim etapie dyspersję bilosomalną poddaje się sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej, w wyniku czego otrzymuje się populację małych jednowarstwowych pęcherzyków, które przechowuje się w temperaturze 4°C do ich późniejszego wykorzystania.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że dodaje się fosfatydylocholinę z żółtek jaja kurzego (PC) w ilości 6 mg/ml, chlorek 1,2-dioleoil-3-trimetyloamoniopropanu (DOTAP-C1) w ilości 4 mg/ml oraz 1,2-distearoil-sn-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikol polietylenowy) 2000] (DSPE-PEG2000) w ilości 0,5 mg/ml.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że rozpuszczalnik organiczny całkowicie odparowuje się przez 10 min pod zmniejszonym ciśnieniem za pomocą wyparki rotacyjnej.
6. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego do kolbki okrągłodennej dodaje się szklaną kulkę w celu ułatwienia tworzenia się struktur pęcherzykowych z filmu lipidowego podczas procesu jego uwadniania.
7. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że dyspersję poddaje się działaniu ultradźwięków przez okres od 1 do 5 min, w temperaturze pokojowej.
8. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że mieszaninę poddaje się działaniu ultradźwięków przez 3 min.

Rysunki

Tabela 1. Skład oraz parametry opisujące otrzymane układy bilosomalne.

Lp.	UKŁAD BILOSOMALNY				CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA			
	PC ^a [$\frac{mg}{ml}$]	DOTAP-Cl ^b [$\frac{mg}{ml}$]	SC ^c [$\frac{mg}{ml}$]	DSPE-PEG2000 ^d [$\frac{mg}{ml}$]	DH ^e [nm]	PdI ^f	ζ^g [mV]	
I	6	4	1	-	75	0,283	+72	
II	6	4	1	0,5	68	0,289	+47	
III	5	5	1	-	108	0,341	+79	
IV	5	5	1	0,5	71	0,309	+58	
V	4	6	1	-	93	0,275	+76	
VI	4	6	1	0,5	68	0,305	+53	
VII	3	7	1	-	118	0,355	+78	
VIII	3	7	1	0,5	94	0,226	+60	

^a PC: fosfatydylocholina z żółtek jaja kurzego (ang. phosphatidylcholine from egg yolk);

^b DOTAP-Cl: chlorek 1,2- dioleoil-3-trimetyloamoniopropanu (ang. 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium - propane chloride);

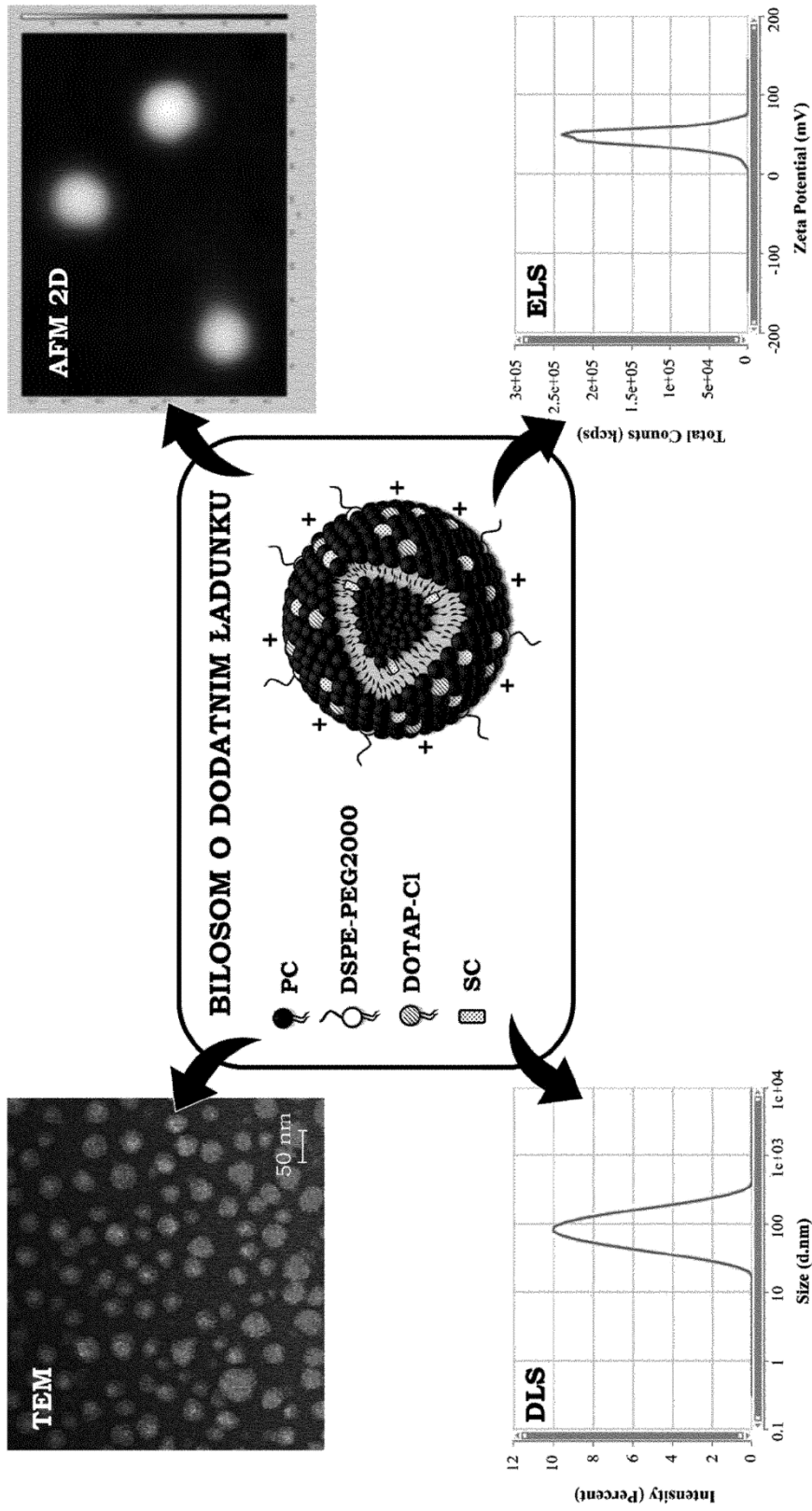
^c SC: hydrat cholany sodu (ang. sodium cholate hydrate);

^d DSPE-PEG2000: 1,2-distearoil-*sn*-glicero-fosfoetanolamino-N-[metoksy(glikolu polietylenowego) 2000] (ang. N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine);

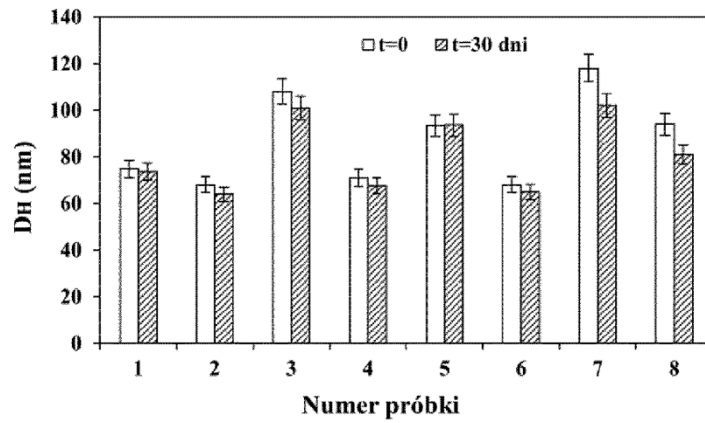
^e DH: średnica hydrodynamiczna (ang. hydrodynamic diameter);

^f PdI: współczynnik polidispersyjności (ang. polydispersity index);

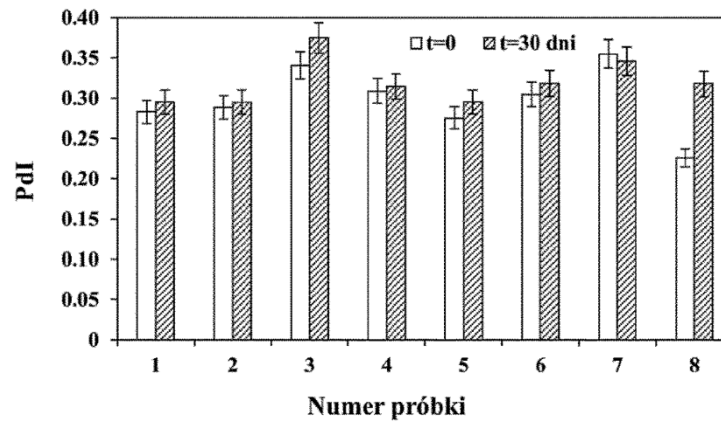
^g ζ : potencjał zeta (ang. zeta potential).



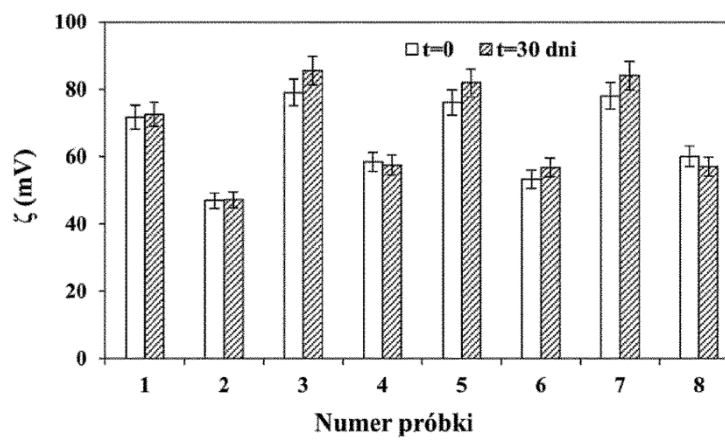
Rys.1.



Rys.2.



Rys.3.



Rys.4.