

Изобретение относится к липосомным композициям, содержащим в качестве активного ингредиента селегилин (-)-(N- $\alpha$ -диметил-N-(2-пропинилфенил)этиламин) и/или его соль. Далее, изобретение относится к их получению, содержащим их фармацевтическим композициям и их терапевтическому использованию.

На сегодняшний день известно огромное количество липосомных композиций и способов их изготовления.

Таковыми композициями являются, например, "системы доставки лекарств" (DDS), как описано G. Gregoriadis с соавт. (Receptor-mediated targeting of drugs, Plenum Press, New York, 243-266, 1980). Они содержат активный ингредиент, в инкапсулированном виде, заключенный в одну или более ламеллярных мембран содержащих липиды, то есть, в липосомах. На хорошую адсорбцию и биопредрасположенность активного ингредиента(ов) может влиять, среди прочих, состав и способ получения липосом, таким образом, что они могут доставлять активный ингредиент в специфичную область. В липосомных композициях активный ингредиент окружен одним или большим количеством липидных ламелл, которые также служат в качестве носителя активного ингредиента.

Мультиламеллярные липидные носители (MLV) впервые были получены и описаны Bangham с соавт. (J. Mol. Biol. 13, 238-252, 1965). Когда биологически активные вещества инкапсулированы в малые одноламеллярные липидные везикулы, водорастворимые вещества можно инкапсулировать с низкой эффективностью, вследствие небольшого объема воды, заключенной в малые одноламеллярные липидные везикулы (SUV) (описание к Патенту США № 4,089,801).

Одноламеллярные липидные везикулы были получены другими методами, то есть, путем инъекции этанола [S.Batzri и E.D.Korn: Biochem. Biophys. Acta. 298:1015-1019, (1973)] или эфира эфира [D.Deamer и A.D.Bangham: Biochem. Biophys. Acta 443, 629-634, (1976)] таким образом, что раствор липидов в органическом растворителе быстро вводили в буферный раствор и, таким образом, спонтанно образовывались одноламеллярные липосомы. Метод является быстрым и широко используется, но приводит к получению разведенных липосомных рецептур и имеет плохую инкапсулирующую эффективность.

Одноламеллярные липосомы также могут быть получены используя так называемую детергент-устраняющую систему [H.G.Weder и O.Zumbuehl: Liposome Technology, под редакцией G.Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Том 1, Часть 7, стр.79-107, (1984)], при использовании которой липиды и другие вещества растворяют вместе с детергентами и затем детергенты устраняют диализом.

Получение одноламеллярных липосомных капсул проводят в соответствии с описанием к Патенту США № 4,234,871 (Papahadjopoulos) путем так называемой технологии выпаривания с обращенной фазой (REV) и в соответствии с описанием Патента США № 4,016,100 (Suzuki), путем лиофилизации водно-липидной дисперсии липидов и биологически активного вещества.

В опубликованном описании к заявке № WO 93/20934 раскрыто получение стабильной водной липосомной суспензии, которая может храниться в течение 6 месяцев при 40°C.

В процессе получения вышеуказанных липосомных композиций дисперсию липидов и водной фазы вводят во взаимодействие на инертном твердом материале, в большинстве случаев, на стеклянных шариках [описание к Патенту США № 4,485,054].

В соответствии с описанием к Патенту США № 4,761,288, который специально включен сюда в качестве ссылки, мультифазные системы получают для улучшения адсорбции биологически активных веществ, имеющих плохую растворимость в воде, которые содержат активный ингредиент в форме высоконасыщенного раствора, в твердой форме и инкапсулированы в одноламеллярные липидные везикулы. Везикулы, раствор и твердая форма биологически активного соединения диспергированы в гидроколлоидном геле. Гидроколлоидный гель получают, используя способ получения мультиламеллярных липидных везикул, описанный в Патенте США № 4,485,054, который специально включен сюда в качестве ссылки. Таким образом, можно получить липосомные композиции, в которых активный ингредиент присутствует в более высоких концентрациях, чем можно ожидать исходя из их водно-или/или липорастворимости.

В описании к Патенту США № 4,937,078 раскрыты липосомные композиции локально применяемых анестетиков и анальгетиков, используемых в качестве активных ингредиентов. Было обнаружено, что локально применяемые активные ингредиенты являются более эффективными в липосомно-инкапсулированном состоянии, чем обычная мазь, крем или липидные композиции. Образование самой липосомы может быть проведено как описано в описаниях к Патентам США № 4,485,054 и № 4,761,288.

Получение всех липосомных композиций было направлено, прежде всего, на увеличение абсорбирующей способности и локальной концентрации и/или на запланированную абсорбцию активных ингредиентов, имеющих плохую растворимость в воде.

Наше изобретение относится к получению липосомных композиций из селегилина или его солей, которые хорошо растворимы в воде и растворителях (1г / 3мл в воде, 1г / 5мл в хлороформе или 1г / 3мл в этаноле), а также, к оральному, парентеральному или местному терапевтическому применению, необязательно, в композициях с контролируемым чрезкожным высвобождением.

Селегилин является известной фармацевтической композицией, широко продаваемой под названием Джумекс, Депренил, Елдеприл или L-Депренил, будучи очень эффективной, например, при лечении туберкулеза или при иммунной модуляции [A.Dow: The Депренил Story, Toronto: Stoddard (1990); Inhibitors of Monoamine Oxidase B, под редакцией I.Szelenyi, Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 237-358 (1993)]. Одним из его важных свойств является антидепрессантная, психостимулирующая и МАО-ингибиторная активность (моноаминоксидаза), более точно, их селективная МАО-B ингибиторная активность. Известны несколько способов их получения, см., например, описания к Патентам Венгрии № 151,090, 154,655 и

187,775. L-Депренил, одобрен FDA в 1989, как агент для лечения болезни Паркинсона.

Липосомная композиция, в соответствии с настоящим изобретением, содержит, предпочтительно, от 0,1 до 40% по весу селегина (-)-[N- $\alpha$ -диметил-N-(2-пропинилфенилэтиламин) и или его соли, от 2 до 40% по весу липидов, предпочтительно, фосфолипидов, от 0 до 10% по весу холестерина, от 0 до 20% по весу спирта, от 0 до 25% по весу гликоля, от 0 до 3% по весу антиоксиданта, от 0 до 3% по весу консерванта, от 0 до 2% по весу агента, влияющего на вязкость, от 0 до 50% по весу циклодекстрина или производного циклодекстрина и от 30 до 90% по весу воды.

Липосомная композиция, в соответствии с настоящим изобретением, содержит, предпочтительно, от 0,1 до 20, наиболее предпочтительно, от 0,1 до 10% по весу селегилина и/или его солей и, по крайней мере, 10% по весу от этого количества в одно-и или мультламеллярной липидной везикуле и остаточное необходимое количество, до 100% по весу, в свободном состоянии и/или как насыщенный раствор. Липосомная композиция, в соответствии с изобретением, содержит в качестве липида, предпочтительно, фосфолипид, предпочтительно, фосфатидилхолин, и/или лизофосфатидилхолин, и/или фосфатидилсерин, и/или фосфатидилэтаноламин, и/или фосфатидилинозитол; в качестве спирта, предпочтительно, этанол или изопропанол; в качестве гликоля, предпочтительно, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль; в качестве антиоксиданта, предпочтительно, токоферол или BHA (бутилгидроксианизол); в качестве консерванта, предпочтительно, гермабен (International Specialty Product, Vienna, Austria); в качестве агента, влияющего на вязкость, предпочтительно, углевод или производное целлюлозы, предпочтительно, карборол (Carbomer, Goodrich, Cleveland); и в качестве циклодекстрина и/или производного циклодекстрина, предпочтительно,  $\alpha$ -,  $\beta$  или  $\gamma$ -циклодекстрин, водорастворимый полимер циклодекстрина, метилированное, гидроксильное или сукциниметилированное производное циклодекстрина или его любые смеси.

Композиции, в соответствии с изобретением, могут содержать липосомную композицию, при желании, вместе с широко используемыми наполнителями, разбавителями или вспомогательными агентами. Композиция может быть введена, предпочтительно, орально, парентерально или в трансдермальной форме. При получении трансдермальной рецептуры, липосомная композиция может быть нанесена на несущую поверхность, предпочтительно, на фольгу, пленку или пластик.

Липосомные композиции могут быть получены как раскрыто в описаниях к Патентам США № 4,485,054 и 4,761,288, органический растворитель выпаривают из смеси органического растворителя содержащего липорастворимые компоненты, содержащего, по крайней мере, один липид и селегиллин, затем объединяют с водным раствором водорастворимых компонентов при перемешивании. В качестве смеси органического растворителя, предпочтительно, используют смесь хлороформа и метанола.

Липосомные композиции, в соответствии с изобретением, могут, предпочтительно, быть использованы для лечения болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, депрессии, паралича, расстройств движения или миелита.

Липосомная композиция содержит активный ингредиент в мультифазной, одной/или мультламеллярной везикуле, в свободном состоянии и в его насыщенном растворе, то есть, мультифазной липосомной системе доставки лекарства. Полученная таким образом липосомная система является стабильной и может легко быть разбавлена водой. Ее реологические свойства можно варьировать от разбавленной жидкости до состояния желатина.

С фармакологической точки зрения мы ставили цель получить липосомные композиции содержащие селегиллин, которые являются системами доставки лекарств с контролируемым их высвобождением и, таким образом, способны высвобождать точные дозы во время трансдермального лечения даже при режиме дозирования "раз в неделю". Способ введения и доза зависят, среди прочего, от заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, депрессия, паралич, расстройство движения или миелит), от его тяжести, общего состояния пациента и пр.

Фармакологические и фармакокинетические исследования липосомных композиций *in vivo* проводились на морских свинках-альбиносах с весом от 300 до 350г (линия Charles-River, SPF: специфичное непатогенное качество) путем местного лечения, групп состоящих из трех животных, случайно отобранных для тестирования.

Вторая фаза экспериментов была проведена на свинках весом от 20 до 22кг, путем лечения трех животных единственной дозой одной из формул.

Животных содержали раздельно в вольерах, на подстилке из древесной стружки при средней температуре 23°C, с одинаковым кормом и питьем.

В качестве тестируемых композиций были использованы продукты в соответствии с Примерами 1, 2, 3 и 6.

Липосомные препараты Депренила прилагали на безволосую часть спины (морские свинки) или кожу шеи (свиньи) на поверхность 1,5 x 1,5 и 3 x 3см<sup>2</sup> соответственно, и, после высушивания в течение нескольких минут, закрепляли Tegadem (производимым 3М, США). В качестве контроля свиньям орально один раз в день вводили таблетки селегилина.

Во время оценки измеряли MAO-ингибирование в крови, мозге, печени и кишечнике, далее - концентрацию активного ингредиента в крови. Накопление активного ингредиента и его метаболитов в различных органах свиней (крови, мозге, сердце, печени, почках, легких и селезенке) было исследовано после введения липосом с селегилином, меченных <sup>3</sup>H-изотопом, методом определения радиоактивности.

Отбирали пробы крови для определения концентрации в сыворотке до лечения и после 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 часов после введения. Было измерено количество селегилина и его метаболитов, затем измеряли активность тромбоцитов MAO-B.

Зажимы Tagedem были удалены спустя 6 часов и измеряли оставшееся не адсорбированное количество селегилина в спиртовом экстракте. После окончания эксперимента также была измерена МАО-активность на изолированном мозге, печени и кишечнике убитых животных. При определении активности ферментов МАО-А и МАО-В также была исследована селективность ингибирования фермента.

Общая концентрация Депренила и его метаболитов измерялась в крови и изолированном мозге, легких, селезенке, печени, сердце, желудке, тонком и толстом кишечнике и почках убитых животных, также на поверхности кожи, где проводилась липосомная обработка. Образцы крови, для определения интервалов, отбирали из угла глазной щели морских свинок и из большой шейной вены свиней.

По истечении семнадцатого дня морских свинок забивали и мгновенно отбирали пробы крови прямо из сердца. В случае свиней пробы крови отбирали перед забиванием, как описано выше.

Отобранные органы и ткани промеряли и гомогенизировали в 4-кратном объеме физиологического раствора хлорида натрия. Три аликвоты по 5мкл вносили пипеткой в кюветы, содержащие 2мл Solune 350 и 0,5мл изопропанола. Далее с пробами поступали как описано выше для проб крови.

Радиоактивность органов определяют подсчетом сцинтилляций в жидкой фазе, полученные данные дают общее количество измеряемого Депренила и метаболитов.

Количество лекарства, оставшегося на пленке и Tegadem также определяют радиоактивным методом.

Специфическую радиоактивность определяют из аликвотных проб исходных препаратов липосом, которые использовались для подсчета значений, относящихся к органам и тканям.

МАО-активность в мозге определяли методом Вуртмана и Аксельрода [Biochem. Pharmacol. 12, 1414-1419 (1963)], и содержание белка в гомогенизатах определяли методом Лоури с соавт. [J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)].

МАО-активность тромбоцитов исследовали методом Уиллберга и Оурленда [Med. Biol. 54, 137-144(1976)].

Концентрацию селегилина и таких его метаболитов, таких как амфетамин, метамфетамин и дезметил-селегилин, определяли с помощью газовой хроматографии.

Биологические фармакологические результаты разъясняются на следующих фигурах.

Фигура 1 и 2 показывают данные уровня метаболитов селегилина, например, метамфетамина, в крови после одного трансдермального прикладывания селегилин-липосомной композиции.

В течение 24 часов (Фигура 1) измеряли дозо-зависимый уровень в крови, когда прикладывали, в основном, одноламеллярную липосомную композицию с маленькими везикулами с распределением в соответствии с Примером 6, при использовании которой абсорбция и метаболизм происходят быстро.

В основном, мультиламеллярные липосомы попадающие в диапазон распределения частиц с большим размером (Примеры с 1 по 3) приводят к медленному снижению уровня в крови, компоненты имеющие низкое число ламелл обеспечивают относительно высокий уровень в крови в течение 72 часов и мультиламеллярная композиция обеспечивает промеряемый уровень в крови даже после 168 часов (Фигура 2).

В случае тех же композиций также можно установить, что композиция, обеспечивающая быструю абсорбцию, обеспечивает стабильное МАО-ингибирование, в то время как медленная адсорбция ведет к относительно быстрому восстановлению ингибирования в крови (Фигуры 3 и 4). Сходные данные были получены также при измерениях в мозге (Фигуры 5 и 6).

Сходные уровни в крови были получены в радиоактивных тестах на морских свинках (неизмененный селегилин и его метаболиты вместе) (Фигура 7). В случае липосом с медленной адсорбцией, определяли значительный уровень в органах, несмотря на то, что уровень в крови снижался к 168 часу, как в мозге являющегося важным из-за эффекта, так и в печени, которая играет важную роль в метаболизме и во всех липофильных органах (Фигура 8 и Таблица 1). Эти органы могут служить как депо, выпускающее активный ингредиент позднее. Кишечник содержит относительно малое количество субстанции, таким образом поддерживая данные ингибирования и отсутствие МАО-А ингибирования (Фигура 5). Фигура 9 (Таблица 1) сравнивает уровни, полученные в органах с количеством субстанций, аккумулированных в коже. Хорошо видно, что хотя получают в органах значительные, выше 10нг/г, значения, которые выше известных постсмертных человеческих данных (пунктирная линия в Фигуре), все же присутствует значительный запас в коже, который может обеспечить поставку активного ингредиента в течение длительного времени. Различные дозы, от 10 до 140мг, приводят к значительно более высокой разнице в крови (примерно, в 100 раз выше), чем в мозге (всего от 2 до 3 раз выше) (срав. Фигуры 7 и 8).

Исследования подтверждают следующие преимущества липосомных композиций, содержащих селегилин:

Активный ингредиент не попадает в желудочно-кишечный тракт, приводя, таким образом, к значительному понижению ингибирования сконцентрированного там МАО-А фермента, играющего важную роль в метаболизме тирамина, так как он не контактирует с активным ингредиентом.

Будучи введен любыми другими путями введения, кроме орального (внутривенное, внутримышечное, глазные капли, капли в нос, распылитель и пр.), активный ингредиент избегает vena portae (лат. воротная вена) и, таким образом, первого пути метаболизма. Таким образом, это обеспечивает повышенный уровень селегилина и пониженный уровень метаболита, понижение МАО-А-ингибирования. Менее возможно, что имеет место эффект "cheese" ("сыра"). Более высокие дозы могут быть применены без побочных эффектов и, например, может быть расширено применение в качестве антидепрессанта. Метаболиты являются стимуляторами и вызывают бессонницу, снижение их уровня означает снижение побочных эффектов.

При чрезкожном введении кожа сохраняет количество активного ингредиента, необходимого для

продолжительной адсорбции, путем, не лимитирующим его функцию.

Абсорбция липосомной композиции (в зависимости от состава) занимает примерно от 1 до 20 минут, после чего не нужна какая либо повязка и покрытие (повязка, Tegadem), композиция не может быть смыта, таким образом, не препятствует умыванию, ее удаление не может быть источником страха даже при слабоумии. При изменении состава (композиции или размера частиц) может быть достигнута оптимальная задержка (1 день, 1 неделя, несколько недель). При изменении отношения инкапсулированного и свободного ингредиента может быть достигнуто стабильное соотношение ингредиент: метаболит, которое оптимально в отношении нейрозащитного и нейроподдерживающего эффектов.

Изобретение разъясняется следующими не ограничивающими примерами.

Примеры с 1 по 6

Получение липосомной композиции Депренила

Пример 1

20г Фосфолипона 90-G (ненасыщенного фосфолипида) и 10г гидрохлорида селегилина растворяют в круглодонной колбе в 20мл смеси 2:1 хлороформа с метанолом при температуре 40°C. К раствору добавляют 100г маленьких стеклянных горошин. Растворитель выпаривают в вакууме в Rotavapor, и во время этой процедуры на стенке стеклянной колбы и на поверхности стеклянных горошин формируется тонкая пленка. Туда добавляют 70 г смеси 1:3 этанола и воды, нагретой до 40°C. Содержимое колбы хорошо перемешивают и затем перемешивают при средних оборотах, 200оборотов/минуту в течение 30 минут при 35°C. Стеклянные горошины отфильтровывают через воронку Бюхнера без фильтровальной бумаги. Фильтрат оставляют на один час при комнатной температуре для формирования липосомной системы. Формирование липосом подтверждают исследованием на оптическом микроскопе. Общий вес этого липосомного продукта (CH-L-1) равен 100г.

Липосомная структура подтверждается микроскопическим исследованием и измерением распределения размера частиц.

Пример 2

Композицию липосомного селегилина получают как описано в Примере 1 с той разницей, что в качестве фосфолипида используют Фосфолипон 90-H. Получают также 100г продукта (CH-L-2). Его липосомную структуру доказывают микроскопическим исследованием и измерением распределения размера частиц.

Пример 3

Процесс проходит как описано в Примере 1 с той разницей, что фосфолипид в количестве, меньшем, чем 1г, и холестерол в количестве 1г растворяют в смеси органического растворителя. Полученный продукт называют (CH-L-3).

Пример 4

Процесс проходит как описано в Примере 1 с той разницей, что использовали 20г селегилина и 30г фосфолипида. Микроскопическим исследованием и измерением распределения размера частиц 118г продукта доказано, что продукт является липосомной композицией.

Пример 5

Процесс происходит как описано в Примере 2, но использовали 30г селегилина, 40г фосфолипида и 40мл смеси хлороформа и метанола. Было получено 135г продукта и доказано, что он является липосомной композицией путем его микроскопического исследования и измерения распределения размера частиц.

Пример 6

Процесс происходит как описано в Примере 1 с той разницей, что использовали 16г Фосфолипона 90-H, 4г холестерина. 10г гидрохлорида селегилина, 50г дистиллированной воды и 5г пропилен гликоля и качание проводили при оборотах 250оборотов/минуту.

Путем микроскопического исследования и измерения распределения размера частиц доказано, что полученный продукт (CH-L-10) является липосомной композицией. Его средний размер частиц меньше, чем у продуктов, полученных в соответствии с Примерами с 1 по 5.

Таблица 1

Радиоактивность различных органов (в мкгкв/г ткани) морских свинок через одну неделю после введения 140мг заключенного в липосомы <sup>3</sup>H депренила (содержащих 14мг депренила, примерно 42мг/кг). Первые данные (в квадрате) измерены через 24 часа, не включали в средние значения

органы	Измеренная радиоактивность (мкгкв/г)								
	CHL-1			CHL-2			CHL-3		
	знач.	сред.	S. D.	знач.	сред.	S. D.	знач.	сред.	S. D.
мозг	0,942			0,416			0,168		
	0,123	0,096	0,038	0,217	0,238	0,169	0,035	0,259	0,084
	0,069			0,080			0,273		
легкие	2,370			0,150			0,285		
	0,252	0,220	0,045	0,496	0,271	0,195	1,016	0,599	0,376

серце	0,188			0,167			0,497		
	3,572			0,555			0,447		
селез.	0,160	0,175	0,021	0,855	0,550	0,308	2,074	0,987	0,941
	0,191			0,239			0,441		
печень	0,199			0,630			0,367		
	0,191	0,195	0,005	0,376	0,395	0,226	0,707	0,615	0,217
почки	1,069			0,179			0,770		
	0,052	0,052	0,0007	0,143			0,102		
желуд.	0,053			0,121	0,110	0,040	0,124	0,126	0,026
	1,704			0,065			0,153		
тонкий кишеч.	0,229	0,198	0,043	0,417			0,353		
	0,167			0,330	0,308	0,121	0,421	0,422	0,069
толст. кишка	0,975			0,178			0,491		
	0,018	0,021	0,004	0,019			0,063		
кожа	0,024			0,030	0,029	0,010	0,037	0,054	0,015
	0,183			0,039			0,063		
	0,016	0,012	0,004	0,021	0,017	0,007	0,015	0,018	0,006
	0,009			0,009			0,015		
	0,164			0,031			0,014		
	0,005	0,012	0,009	0,034	0,027	0,010	0,008	0,013	0,004
	0,019			0,016			0,016		
	80,493			53,521			22,550		
	5,856	51,798	64,972	25,633	62,160	41,527	19,081	19,410	2,989
	97,741			107,327			16,399		

Фигура 1: Средние уровни метамфетамина ( $\pm$  SD, n = 3) в плазме свиней после орального или чрезкожного лечения (-) Депренил (CHL-10)

Фигура 2: Средние уровни метамфетамина ( $\pm$  SD, n = 3) в плазме свиней после чрезкожного лечения липосомной композицией, содержащей (-) Депренил

Фигура 3: MAO-B-ингибирование тромбоцитов после чрезкожного введения липосомной композиции (CHL-10) и орального введения традиционных таблеток

Фигура 4: MAO-B-ингибирование в тромбоците в течении 168 часов после чрезкожного введения мультимиллярной липосомной композиции

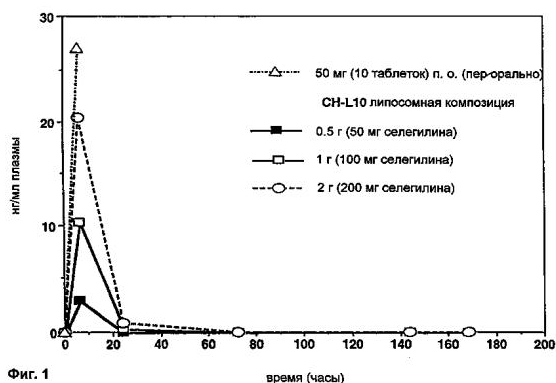
Фигура 5: MAO-ингибирование в мозге, печени и тонком кишечнике в течении 168 часов после чрезкожного введения липосомной композиции CHL-2

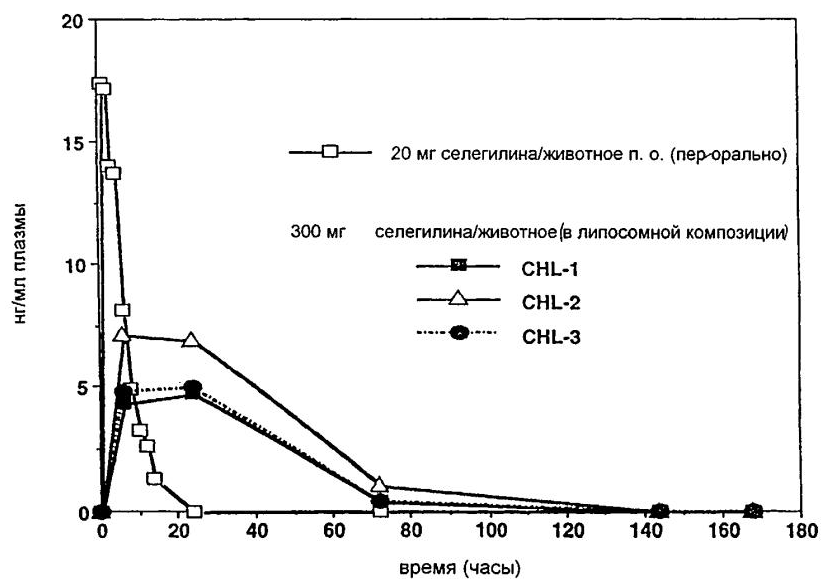
Фигура 6: MAO-ингибирование в мозге и печени в течении 168 часов после чрезкожного введения липосомных композиций

Фигура 7: Концентрации в сыворотки, подсчитанные на основе радиоактивности (немеченое вещество и метаболит) после чрезкожного введения различных доз композиции CHL-2

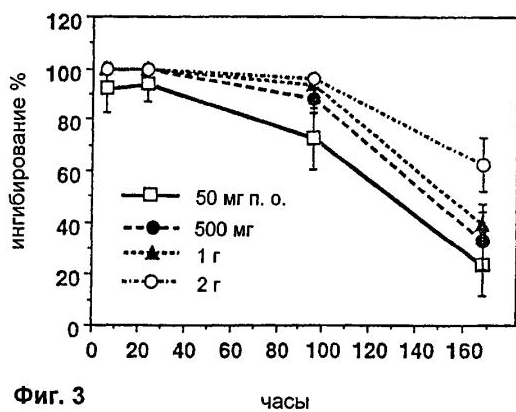
Фигура 8: Концентрация радиоактивного вещества (селегилин+метаболиты) в течении 168 часов после чрезкожного введения композиции CHL-2

Фигура 9: Радиоактивность различных органов морских свинок и таковая в месте приложения в течении 168 часов после чрезкожного введения композиции CHL-2.

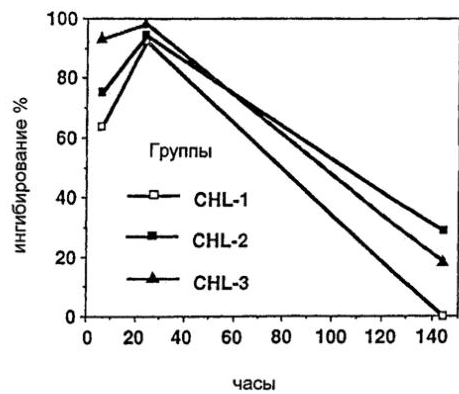




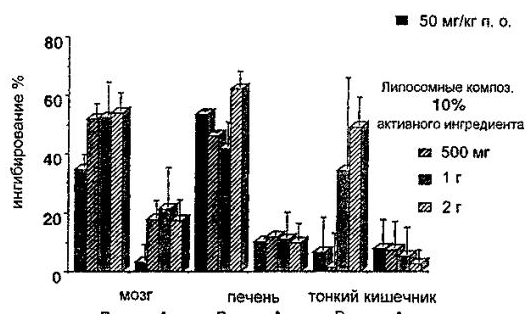
Фиг. 2



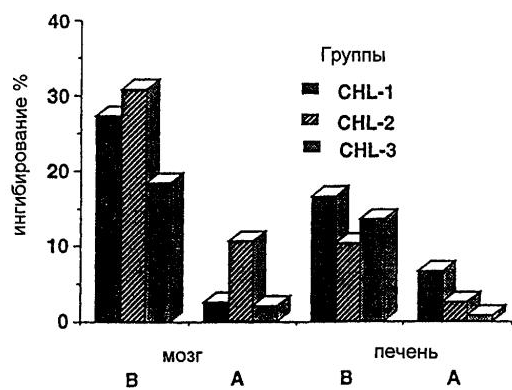
Фиг. 3



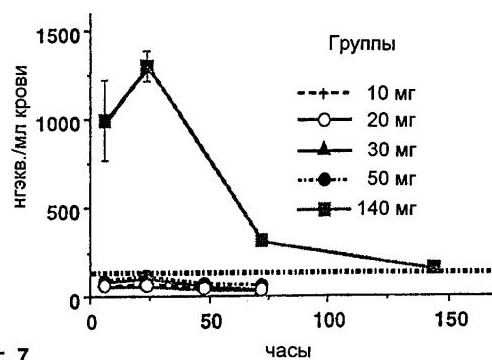
Фиг. 4



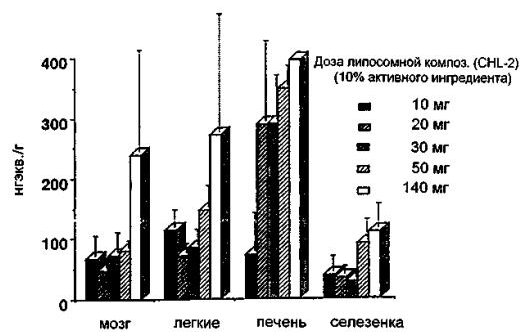
Фиг. 5



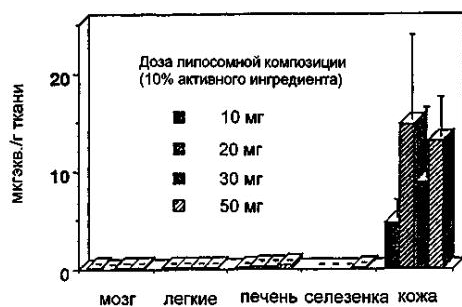
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9