

Данное изобретение относится к быстрорастворимому (инстантизированному) везикулярному продукту, способу его получения и композициям, содержащим этот продукт.

Везикулы (пузырьки) в аполярных носителях были описаны в 1991 году Н. Kunieda et al (J. Am. Chem. Soc. 113 (3) 1051-1052). Было обнаружено, что вывернутые ("вывернутые наизнанку") везикулы, состоящие в основном из гидрофильного поверхностно-активного вещества додецилового простого эфира тетраэтиленгликоля в додекане, коалесцируют и возвращаются в прежнее состояние, в ламеллярную жидкокристаллическую фазу, на протяжении периода от часов до дней, несмотря на добавление приблизительно 2,5 молекул воды на этиленоксидную единицу. В следующих публикациях на ту же тему и те же авторы описали преимущество использования углеводородных соединений с прямой цепью в качестве аполярной среды (Н. Kunieda et al: Langmuir 1991 (7) 1915-1919, J. Coll. Interf. Sci. 1991 (147) 286-288, JO. Coll. Interf. Sci. 1993 (156) 446-453). Однако, такие дисперсии имеют очень ограниченное практическое значение для разработки продукта в связи с очень плохими косметическими и вкусовыми свойствами этих соединений, их токсическими свойствами, а также вследствие того, что эти соединения не являются биodeградируемыми. В публикации Международной патентной заявки WO 93/00069 описаны дисперсии вывернутых везикул в аполярных носителях, причем эти везикулы были стабильны на протяжении значительного периода времени. Дисперсии описанных в этой заявке везикул получали обработкой ультразвуком смеси, состоящей из одного или нескольких поверхностно-активных веществ, липофильного стабилизирующего фактора, необязательно гидрофильного стабилизирующего фактора и аполярного носителя. Компоненты для получения вывернутых везикул в принципе могут быть выбраны из разнообразных материалов. Однако, при замене углеводородных соединений биodeградируемыми аполярными соединениями, такими как сложные триэфиры глицерина и высоконасыщенных и ненасыщенных жирных кислот, имеющих 10-30 атомов углерода, и растительными маслами выход вывернутых везикул, оцениваемый при помощи микроскопии в поляризованном свете, является довольно низким согласно опыту авторов данного изобретения, по сравнению с выходом, получаемым, когда такие везикулы готовят в углеводородном носителе.

Поскольку дисперсии вывернутых везикул проявили явные преимущества над везикулами в водных средах, среди прочих свойств - высокую инкапсулирующую способность как для липофильных, так и для гидрофильных лекарственных средств, существовала необходимость в нахождении путей увеличения выхода вывернутых везикул в аполярных фармацевтически и косметически приемлемых носителях, таких, как вышеупомянутые триэфиры глицерина и растительные масла, без неблагоприятного влияния на их инкапсулирующую способность и эффективность. В публикации Международной патентной заявки WO/20945 описана дисперсия вывернутых везикул, которую получали из особым образом обработанных галактолипидов, полученных из зерен овса, в МСТ-масле обработкой ультразвуком в течение 1 часа при 30-40°C. Присутствие больших вывернутых везикул оценивали при помощи дифференциально-интерференционного фазово-контрастного микроскопа, но не проводилась оценка количества образующихся везикул и не было дано распределение размера частиц. Указывалось, что эти дисперсии стабильны в течение приблизительно одной недели.

В настоящее время обнаружено, что путем приготовления первичной дисперсии вывернутых везикул в подходящем аполярном носителе и затем удаления этого аполярного носителя получают порошок вывернутых везикул, который при диспергировании в том же самом аполярном носителе сохраняет его везикулярную структуру и, таким образом, снова моментально получают дисперсию вывернутых везикул. Неожиданно тот же самый порошок вывернутых везикул при диспергировании в другом аполярном носителе, таком, как биodeградируемое масло, также сохраняет его везикулярную структуру и таким путем моментально получают вторичную дисперсию вывернутых везикул. Количество вывернутых везикул в биodeградируемом масле оказывается очень высоким по сравнению с выходом вывернутых везикул при их приготовлении непосредственно в биodeградируемом масле.

Порошок вывернутых везикул содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ и необязательно липофильный стабилизирующий фактор, такой, как холестерин. Другие примеры соединений, которые могут быть использованы в качестве липофильного стабилизирующего фактора, можно найти в WO 93/00069. Кроме того, этот продукт может содержать биоактивный агент. Неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой предпочтительно производное пентозы, гексозы или их олигомера, такое, как сложный эфир жирной кислоты или простой эфир жирного спирта. Предпочтительным неионогенным поверхностно-активным веществом является сложный эфир жирной кислоты и пентозы, такой как ксилоза, гексозы, такой как глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза или мальтит, или их олигомера, такого как сахароза, лактоза или лактулоза. Поскольку пентозы и гексозы используют более одной этерифицируемой гидроксигруппы, сложные эфиры жирной кислоты этих соединений состоят из смеси моно-, ди-, три- и полиэфиров. Наиболее предпочтительно использовать те продукты, которые содержат по меньшей мере 50масс.% моноэфиров, и еще более предпочтительны соединения, содержащие по меньшей мере 70масс.% моноэфиров в расчете на массу поверхностно-активного вещества. То же самое относится к соответствующим соединениям, являющимся простыми эфирами. Подходящими жирными кислотами для этерификации являются насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с прямой C8-C30-цепью, такие как лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, бегеновая кислота и олеиновая кислота. В частности, а также в связи с их коммерческой доступностью, сложные эфиры жирных кислот и сахарозы используют для получения этого быстрорастворимого продукта. Подходящими примерами таких эфиров являются S-970 (стеарат сахарозы, 50% моноэфир, 50% ди-, три- и полиэфир); P-1570 (пальмитат сахарозы, 70% моноэфир); S-1670 (стеарат сахарозы, 75% моноэфир); M-1695 (миристат сахарозы, 80% моноэфир) и L-1695 (лаурат сахарозы, 80% моноэфир).

Порошок вывернутых везикул получают при помощи способа, который включает следующие стадии:

- приготовление первичной дисперсии вывернутых везикул обработкой ультразвуком или микрофлюидизацией смеси, состоящей из одного или нескольких поверхностно-активных веществ и необязательно липофильного стабилизирующего фактора и биоактивного агента в подходящем аполярном носителе и

- последующее удаление аполярного носителя.

Вывернутые везикулы и/или компоненты, составляющие везикулы, в том числе биоактивный агент, являются нерастворимыми или практически нерастворимыми в аполярном носителе, который должен быть использован для приготовления первичной дисперсии вывернутых везикул. Аполярный носитель выбирают из соединений или их смесей, которые, в случае использования затем способов выпаривания, предпочтительно имеют высокое давление пара, в частности, ниже температуры, при которой эти везикулы плавятся. Примерами таких аполярных носителей являются летучие силиконовые масла, такие, как Abil® K4, изоалканы, такие, как изопарафины, и (C1-C4)-алкилалканоаты, такие, как этилацетат.

Первичная дисперсия вывернутых везикул может быть приготовлена в соответствии со способами, известными в данной области, например, такими, которые описаны в публикации Международной патентной заявки WO 93/00069. Предпочтительно во время приготовления первичной дисперсии вывернутых везикул добавляют гидрофильный стабилизирующий фактор, такой, как вода. Как выяснилось, небольших количеств ее достаточно для уменьшения размера частиц везикул и, в результате этого, для увеличения количества вывернутых везикул и скорости, с которой вывернутые везикулы образуются. Например, в случае использования в качестве поверхностно-активного вещества сложного эфира сахарозы предпочтительно использовать количество воды до 15масс.% в расчете на массу поверхностно-активного вещества. Более предпочтительно добавлять 5-10%масс.% воды во время приготовления первичной дисперсии вывернутых везикул. Как оказалось, воду можно добавлять на нескольких стадиях во время приготовления, но предпочтительно она присутствует с самого начала приготовления.

Удаление аполярного носителя из первичной дисперсии вывернутых везикул можно проводить несколькими путями, такими, как испарение, центрифугирование, фильтрование, лиофилизация и т. д. Однако, важно, чтобы бислойная структура везикул не была нарушена во время удаления. Предпочтительными являются способы испарения, в частности, ротационное испарение и распылительная сушка. При использовании этих способов было обнаружено, что добавление наполнителей, таких, как так называемые криозащитные вещества, используемые во время процессов лиофилизации, не является необходимым.

Продукт, полученный, как описано выше и далее подробно в приведенных примерах, состоит из везикулярной структуры, вследствие чего биоактивный агент, если он включен в первичную дисперсию вывернутых везикул, остается инкапсулированным. Он может быть включен вместе с одним или несколькими наполнителями в композиции, что является другим аспектом данного изобретения. Эти наполнители могут быть твердыми в форме сухих порошков или гранулятов для приготовления таблеток, капсул и т. д. Наполнители для приготовления дисперсий могут быть также жидкими или полутвердыми. Жидкостью может быть полярное соединение, такое, как вода или пропиленгликоль, или биodeградируемое соединение. Было показано, что таким путем можно приготовить дисперсии вывернутых везикул в биodeградируемом аполярном соединении в высоком количестве по сравнению с дисперсиями, непосредственно приготовленными в биodeградируемом соединении согласно способам, известным в данной области. Примерами таких биodeградируемых природных или синтетических соединений являются жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, растительные масла, такие, как арахисовое масло и кунжутное масло и моно-, ди- и триглицериды насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с прямой цепью с 12-30 атомами углерода, таких, как лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота и арахидоновая кислота.

Каким бы ни был путь, при помощи которого продукт данного изобретения включают в композицию, ясно, что плохие косметические и вкусовые свойства нелетучего углеводородного аполярного дисперсионного носителя были устранены. Поскольку на эффективность инкапсулирования вывернутых везикул для биоактивных агентов сильно влияет выбор аполярного носителя, дополнительным преимуществом является то, что продукт данного изобретения получают с использованием аполярного носителя, который не является растворителем предпочтительно также для биоактивного агента. При диспергировании этого продукта в другом аполярном растворителе для моментального получения вторичной дисперсии вывернутых везикул была обнаружена высокая эффективность инкапсулирования биоактивного агента. Другим преимуществом порошка вывернутых везикул является увеличение стабильности различных компонентов и особенно обусловленное структурной целостностью предотвращение утечки биоактивных соединений из везикул.

Хотя данное изобретение было описано подробно путем иллюстрации и примера для ясности и понимания, специалистам со средней квалификацией в данной области будет понятно в свете описаний данного изобретения, что некоторые изменения и модификации могут быть сделаны без отхода от идеи и объема прилагаемой формулы изобретения.

Следующие далее примеры иллюстрируют данное изобретение.

Пример 1

44,375г силиконового масла (AMI® K4), 5г пальмитата сахарозы P1570 (смеси 70% моноэтерифицированной и 30% ди- и полиэтерифицированной сахарозы, полученной от C.N. Schmidt B.V., Amsterdam, The Netherlands), 0,5г холестерина и 0,125г п-аминобензойной кислоты (PABA) отвешивали в термостатированный сосуд при 90°C. Смесь обрабатывали ультразвуком при выходной мощности 97 ватт в течение 30 минут с применением ультразвукового дезинтегратора Branson sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corp. Danbury, U.S.A.) с последующим охлаждением сосуда охлаждающей водой T 5°C в течение 15 минут до достижения комнатной температуры. Во время охлаждения смесь обрабатывали ультразвуком при выходной мощности 97 ватт с рабочим циклом 50%. Кристаллизацию силиконового масла на стенке сосуда в процессе охлаждения предотвращали перемешиванием смеси с использованием стержня магнитной мешалки.

#### 1.1 Удаление аполярного носителя ротационным испарением

50мл дисперсии везикул, полученной таким образом, переносили в круглодонную колбу объемом 250мл. Силиковому маслу давали испаряться с использованием ротационного аппарата Buchi Rotavap (Buchi Laboratoriums AG, Flawil, Switzerland), причем водяную баню поддерживали при 30°C. Скорость вращения круглодонной колбы устанавливали на 5 и давление снижали до 0,1 бар. После завершения испарения оставшуюся пленку собирали и размалывали в ступке.

## 1.2 Удаление аполярного носителя распылительной сушкой

50мл дисперсии везикул переносили в распылительную минисушилку (Buchi 190, Buchi Laboratories AG, Flawil, Switzerland), рабочие условия: ток воздуха 500л/ч, входная температура 67°C, выходная температура 56°C.

### Пример 2

890г силиконового масла Abil® K4, 100г пальмитата сахарозы P1570 и 10г холестерина отвешивали в термостатированный сосуд поддерживаемый при 70°C. Компоненты перемешивали в течение 10 минут с использованием смесителя с высоким усилием сдвига Ultra Turrax. После этой предварительной гомогенизации смесь переносили в микрофлюидизатор M110 T, работающий при давлении 9000 PSI (Microfluidics Corp., Newton, U.S.A.) и проводили несколько циклов. Микрофлюидизатор термостатировали при 30°C с применением устройства Neslab Exascal Ex-410 (Neslab, Newington, U.S.A.). После последнего цикла дисперсию охлаждали при помощи проточного охлаждающего устройства Neslab Endocal RTE 220 (Neslab, Newington, U.S.A.), причем температуру водяной бани устанавливали на 25°C.

## 2.1 Удаление аполярного носителя ротационным испарением

50мл дисперсии везикул, полученной таким образом, переносили в круглодонную колбу объемом 250мл. Силиковому маслу давали испаряться с использованием ротационного аппарата Buchi Rotavap (Buchi Laboratories AG, Flawil, Switzerland), причем водяную баню поддерживали при 30°C. Скорость вращения круглодонной колбы устанавливали на 5 и давление снижали до 0,1бар. После завершения испарения оставшуюся пленку собирали и размалывали в ступке.

## 2.2 Удаление аполярного носителя сухой распылкой

50мл дисперсии везикул переносили в распылительную минисушилку (Buchi 190, Buchi Laboratories AG, Flawil, Switzerland), рабочие условия: ток воздуха 500л/ч, входная температура 67°C, выходная температура 56°C.

### Пример 3

1,125г измельченного в порошок продукта, полученного согласно примеру 1.1, и 8,875г масла, выбранного из группы, состоящей из каприлового/капринового триглицерида (Miglyol® 812N), арахисового масла, касторового масла, олеиновой кислоты и летучего силиконового масла Abil® K4, отвешивали во флакон для пробы объемом 20мл. Смесь перемешивали в течение 10 минут при 150об/мин при помощи магнитной мешалки. Присутствие вывернутых везикул в дисперсиях в виде так называемых Мальтийских крестов оценивали при помощи микроскопии в поляризованном свете (Olympus® Tokyo Japan) сразу же после получения и после хранения этих дисперсий в течение 2 недель при комнатной температуре. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

| порошок диспергированный в | вид  |
|----------------------------|--|
| Miglyol® 812N              | вывернутые везикулы и много агломератов вывернутых везикул     |
| Арахисовом масле           | вывернутые везикулы и много агломератов вывернутых везикул     |
| Касторовом масле           | вывернутые везикулы и много агломератов вывернутых везикул     |
| Олеиновой кислоте          | вывернутые везикулы и несколько агломератов вывернутых везикул |
| Abil® K4                   | вывернутые везикулы и много агломератов вывернутых везикул     |

Никаких изменений по виду после хранения в течение двух недель при комнатной температуре не наблюдалось.

### Пример 4

1,125г измельченного в порошок продукта, полученного в соответствии с примером 1.1, и 8,875г масла, выбранного из группы, состоящей из каприлового/капринового триглицерида (Miglyol® 812N), арахисового масла, касторового масла, и летучего силиконового масла Abil® K4, отвешивали во флакон для пробы объемом 20мл. Смесь перемешивали в течение 10 минут при 150об/мин при помощи магнитной мешалки.

Сразу же после получения эффективность инкапсулирования ПАВА, определяемую как процент ПАВА, инкапсулированной на грамм дисперсии вывернутых везикул, рассчитывали по формуле:

$$EF = [1 - (f \cdot FP / TP)] \cdot 100\%,$$

где: f = весовая фракция неинкапсулированного аполярного носителя;

FP = концентрация (мг/г) ПАВА, растворенной в неинкапсулированном аполярном носителе.

TP = концентрация (мг/г) ПАВА, растворенной в дисперсии вывернутых везикул в аполярном носителе.

Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

| порошок, диспергированный в | Эффективность инкапсулирования (%)<br>среднее±SD(n=3) |
|-----------------------------|---|
| Miglyol® 812N               | 71,8±14,2   |
| арахисовом масле            | 71,2±0,9  |
| касторовом масле            | 57,9±0,8  |
| Abil® K4,                   | 9S,5±0,1  |

### Пример 5

Дисперсию вывернутых везикул в аполярной среде, которая представляет собой каприловый/каприновый триглицерида (Miglyol® 812N), арахисовое масло, касторовое масло, олеиновую кислоту и силиконовое масло

Abil® K4, готовили по способу примера 1.

Вид дисперсии оценивали при помощи поляризационного светового микроскопа, как описано в примере 3, сразу же после приготовления и после хранения дисперсий в течение двух недель при комнатной температуре. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

| дисперсия вывернутых везикул, приготовленная непосредственно в | вид  |
|--|--|
| Miglyol® 812N  | несколько гигантских вывернутых везикул и много не-везикулярного материала                 |
| Арахисовом масле   | несколько вывернутых везикул, несколько кристаллов РАВА и много не-везикулярного материала |
| Касторовом масле   | только не-везикулярный материал  |
| Олеиновой кислоте  | только не-везикулярный материал  |
| Abil® K4   | только вывернутые везикулы   |

Изменения по виду после хранения в течение двух недель при комнатной температуре не наблюдалось.

Эффективность инкапсулирования РАВА не определяли из-за отсутствия (достаточного количества) везикулярного материала.

Пример 6

Силиконовое масло Abil® K4, пальмитат сахарозы P-1570, холестерин и воду в количествах, указанных в таблице 4, отвечивали в термостатированный реакционный сосуд объемом 100мл при 88°C. Смесь обрабатывали ультразвуком при помощи ультразвукового дезинтегратора Branson sonifier 250, снабженного микронаконечником с диаметром 4,8мм, при выходной мощности 88 ватт в течение 30 минут. Затем пробу охлаждали до температуры окружающей среды с применением охлаждающей бани при 15°C. Охлаждение проводили в течение 20 минут при перемешивании для предотвращения агломерации.

Готовили две серии, в которых воду добавляли через 15 и 30 минут, соответственно, после начала обработки ультразвуком.

Все серии перемешивали в герметично закрытых стеклянных флаконах при комнатной температуре.

При диспергировании порошка вывернутых везикул в Abil® K4 наблюдали, что везикулярная структура не была изменена удалением аполярного носителя.

Таблица 4

|                                 |         |        |        |        |                         |                        |        |
|---------------------------------|---------|--------|--------|--------|-------------------------|------------------------|--------|
| пальмитат сахарозы              | 10      | 10     | 10     | 10     | 10                      | 10                     | 10     |
| холестерин                      | 1       | 1      | 1      | 1      | 1                       | 1                      | 1      |
| силиконовое масло               | 89      | 86,5   | 84     | 79     | 79                      | 79                     | 74     |
| содержание воды (%)             | 0       | 2,5    | 5      | 10     | 10<br>после 15<br>минут | 1<br>после 30<br>минут | 15     |
| размер частиц (под микроскопом) | 6-12мкм | 2-6мкм | 1-4мкм | 1-4мкм | 1-4мкм                  | 8-16мкм                | 1-4мкм |
| количество частиц               | -       | +/-    | ++     | ++     | ++                      | -                      | ++     |
| распределение размеров частиц   | -       | -      | +/-    | +      | +/-                     | +                      | +      |
| капли воды                      | -       | -      | -      | -      | -                       | +                      | +      |
| видимые кристаллы               | -       | -      | -      | -      | -                       | -                      | -      |
| скорость седиментации*          | +       | -      | -      | --     | -                       | ++                     | --     |

\* скорость седиментации: ++ очень быстрая, -- медленная

Пример 7

Дисперсии вывернутых везикул, имеющие состав, представленный в таблице 5, готовили в соответствии со способом, описанным в Примере 6. вместо реакционного сосуда использовали закрытый сосуд с двойными стенками. Пробы охлаждали при помощи охлаждающей бани при 7,5°C. В случае использования в качестве аполярного носителя этилацетата температуру, при которой смесь обрабатывали ультразвуком, снижали до 60°C. При диспергировании порошка вывернутых везикул в Abil® K4 наблюдали, что везикулярная структура не была изменена удалением аполярного носителя.

Таблица 5

Дисперсия вывернутых везикул

| Компоненты   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Пальмитат сахарозы P-1570  | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Холестерин   | -  | 1  | 2  | -  | 1  | 2  | -  | 1  | 2  |
| Вода   | -  | -  | -  | 1  | 1  | 1  | -  | -  | -  |
| Изопарафин (Isopar® E, полученный от Exxon Chemical International) | 90 | 89 | 88 | 89 | 88 | 87 | -  | -  | -  |

|                           |     |     |     |     |     |     |      |      |     |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|
| Этилацетат                | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 90   | 89   | 88  |
| Средний размер частиц(пт) | 324 | 471 | 432 | 142 | 120 | 169 | 5138 | 1097 | 426 |
| Стандартное отклонение    | 10  | 15  | 58  | 12  | 8   | 3   | 6396 | 163  | 104 |

#### Пример 8

Дисперсии вывернутых везикул, имеющих состав, представленный в таблице 6, готовили в соответствии со способом, описанным в примере 7.

После удаления аполярного носителя 0,5г порошка вывернутых везикул диспергировали в 15г пропиленгликоля при перемешивании при 150об/мин. После 6 часов во всех сериях можно было наблюдать мальтийские кресты, что было сравнимо с результатами, полученными после диспергирования того же самого продукта в силиконовом масле Abil® K4.

Таблица 6

| компоненты         | %  | %  | %    | %  |
|--------------------|----|----|------|----|
| Пальмитат сахарозы | 10 | 10 | 10   | 10 |
| Холестерин         | 1  | 2  | 1    | 1  |
| Вода               | -  | -  | 0,5  | 1  |
| Abil® K4           | 89 | 88 | 88,5 | 88 |