

Даний винахід стосується водної фармацевтичної композиції, що містить активний інгредієнт з високим ступенем нерозчинності у воді. Зокрема, він стосується фармацевтичної композиції з активним інгредієнтом, що диспергований у ліпосомах.

Незважаючи на значний об'єм досліджень, що проводяться у фармацевтичній галузі для розробки нових ліпосомних препаратів, на цьому шляху виникло багато труднощів, пов'язаних, зокрема, з активними інгредієнтами, котрі характеризуються значною нерозчинністю у воді. Особливо це стосується інгредієнтів, розчинність яких у воді складає  $\leq 0,01\%$  (маса/об'єм).

Фактично, спосіб, що застосовується нині для приготування ліпосом, котрі містять активні інгредієнти з низькою розчинністю у воді, включає:

а) розчинення активного інгредієнта та попередньо вибраних фосфоліпідів у прийнятному органічному розчиннику, наприклад, хлороформі;

б) випарювання даного розчинника за умов пониженого тиску для утворення плівки активний інгредієнт/фосфоліпід;

в) додавання другого органічного розчинника, наприклад, третбутилового спирту;

г) заморожування одержаного розчину при температурі рідкого азоту;

д) ліофілізацію даного замороженого розчину;

е) гідратацію ліофілізованого розчину буферним розчином для утворення суспензії мультиламелярних ліпосом (MLV); та

є) обробку даної суспензії ультразвуком для утворення суспензії менших ліпосом (SUV).

Цей спосіб розглянуто А. Шарма та інш. (A. Sharma et al.) у роботі "Pharmaceutical Research", 2 (6), 889-896 (1994).

Недоліком цього способу є його трудомісткість, і він призводить до появи слідів органічних розчинників у ліпосомах.

Проте вказані автори посилаються на проведені ними дослідження різних способів для приготування MLV ліпосом, таких як гідратація сухих ліпідних плівок (струшування вручну), заморожування-розтавання, та різних способів, таких як екструзія та обробка ультразвуком, для подальшого зменшення (післяобробка) розміру даних ліпосом (MLV→SUV) і роблять висновок, що викладений вище у подробицях спосіб, що включає зазначені стадії а)-є), є, за їх думкою, найбільш прийнятним (loc. cit. с.890, права колонка, рядки 51-57). Проте зазначені автори не вказують, яким чином розглянутий перший спосіб для приготування MLV ліпосом та розглянутий другий спосіб, призначений для зменшення розміру ліпосом, стикаються між собою.

WO-A-96 40064, EP-A-0 578 629, DE-A-4 038 075 та DE-A-4 430 593 розкривають фармацевтичні композиції, де активний інгредієнт, нерозчинний у воді, диспергується у ліпосомах. Таким активним інгредієнтом є циклоспорин-А, мелатонін та, відповідно, таксол.

Проте, жоден із наведених документів не розглядає способу приготування водної ліпосомної композиції, котрий поєднував би способи заморожування та відтавання з екструзією.

Як це не дивно, тепер встановлено, що комбінування способів заморожування та відтавання з екструзією дозволяє одержувати водні ліпосомні композиції активних інгредієнтів із розчинністю у воді  $\leq 0,01\%$  (маса/об'єм) без використання будь-яких органічних розчинників.

У даному викладі та наступній формулі активні інгредієнти, розчинність яких у воді складає  $\leq 0,01\%$  (маса/об'єм), визначені як такі, що "мають високий ступінь нерозчинності у воді".

Відповідно, у першому аспекті даного винаходу запроваджується фармацевтична композиція згідно з п.1.

Далі наведені типові приклади активних інгредієнтів з високим ступенем нерозчинності у воді: лонідамін (розчинність:  $3 \times 10^{-6}$  г/мл), мелатонін ["практично нерозчинний", Г.С. Шида та інші (G.S. Shida et al. "J. Pineal. Res.", 16, 198-201. (1994)], циклоспорин-А ["нерозчинний у воді", монографія по циклоспорину-А у "Analytical Profiles of Drug Substances", 16, 163, (1987)] та біндарит (розчинність:  $1 \times 10^{-4}$  г/мл).

Ліпосоми композицій даного винаходу одержані, переважно, з компонента, вибраного з групи, що включає фосфогліцериди, гліцериди, дигліцериди, тригліцериди, фосфоліпіди, галактозил та глюкозил ліпіди, холестерол та його похідні, сфінголіпіди та їх суміш. Краще, коли вони утворені із фосфоліпідів.

Типовий приклад ліпосомної композиції відповідно до даного винаходу включає фосфатидилхолін, лізофосфатидилхолін, N-ацил-фосфатидилхолін, фосфатидил етаноламін, фосфатидилсерин, сфінгомієлін, неполярні ліпіди, тригліцериди, вільні жирні кислоти, DL- $\alpha$ -токоферол.

Ліпосомна композиція, згідно з даним винаходом, якій віддається перевага, включає:

Компонент	мас. %
фосфатидилхолін	85-97
лізофосфатидилхолін	0-5
N-ацил-етаноламін	0-4
фосфатидил етаноламін	0-10
тригліцериди	0-4
вільні жирні кислоти	0-3
DL- $\alpha$ -токоферол	0-1

Ліпосомна композиція, згідно з даним винаходом, якій віддається особлива перевага, включає:

Компонент	мас. %
фосфатидилхолін	94
лізофосфатидилхолін	3
N-ацил-етаноламін	1
фосфатидил етаноламін	0,1
тригліцериди	1
вільні жирні кислоти	0,75
DL- $\alpha$ -токоферол	0,15

Типовий розмір ліпосом, згідно з даним винаходом, складає менше 500нм. Краще, коли він складає від 50 до 250нм.

У другому аспекті даного винаходу запроваджується спосіб для виготовлення водної фармацевтичної композиції згідно з п.6...

Тривалість стадії с) залежить від кількості активного інгредієнта з високим ступенем нерозчинності у воді, який має бути захоплений зазначеними ліпосомами. Тому фахівець у даній галузі не стикнеться з будь-якими труднощами у цьому плані, оскільки за допомогою кількох простих звичайних експериментів легко визначається необхідний час для кожного типу активного інгредієнта та ліпосомної композиції.

Перевага віддається водній фазі, утвореній з водного розчину хлориду натрію при концентрації 0,05-0,9% (маса/об'єм).

Зазвичай кількість використаного ліпиду складає приблизно 0,01-0,4 масових частин на кожен масову частину водного розчину. У свою чергу, кількість активного інгредієнта звичайно складає від 0,01 до 0,3 масових частин на кожен масову частину ліпиду.

Диспергатором, що звичайно застосовується, є гомогенізатор типу Ультратуракс™ (Ultraturax™).

Звичайно екструзію проводять з використанням стиснутого повітря або інертного газу, що вибраний з групи, котра включає азот, гелій та аргон як екструзійний газ. Перевага віддається інертному газу гелію. Краще, коли на стадії екструзії величина тиску складає 500-5500кПа і температура 20-75°C, і ще краще, коли навіть 40-65°C. Типовими прикладами придатних екструдерів є екструдери типу Ліпекс Біомембрейн Термобарел (Lipex Biomembranes Thermobarrel) або Емульсіфлекс СС Авестин (Emulsiflex CC Avestin) з фільтрами з полікарбонатними (Костар™, Costar™) мембранами, розмір пор яких дорівнює 50-600нм.

Стадію h) звичайно повторюють принаймні двічі і не більше 8 разів. Краще, 6 разів.

Наступні приклади ілюструють даний винахід, не обмежуючи його у будь-який спосіб.

#### ПРИКЛАД 1

100мг мелатоніну диспергували у 1г фосфоліпиду при 30°C протягом 10 хвилин за допомогою гомогенізатора типу Ультратуракс™. негайно після цього дану дисперсію суспендували у 10мл водного 0,9% (маса/об'єм) розчину хлориду натрію, використовуючи зазначений гомогенізатор, і потім нагрівали на водяній бані при 55°C протягом 20 хвилин.

Одержану у такий спосіб суспензію піддавали наступному циклу охолодження та нагрівання:

охолодження у рідкому азоті протягом 1 хвилини,

нагрівання до 55°C, поки фосфоліпиди не ставали цілком рідкими.

Даний цикл повторювали 6 разів.

Цю суспензію пропускали двічі через фільтр 0,6мкм за допомогою апарата Ліпекс Біомембрейн.

Таким чином була одержана суспензія "Мультиламелярних великих везикул" (MLV), котру піддавали 6 циклам безперервної екструзії з використанням 10мл екструдера типу Ліпекс Біомембрейн Термобарел з 0,1мкм полікарбонатними (Костар™) фільтрами при 55°C і гелієм як екструзійним газом при величині тиску в межах 1000-4800кПа.

З використанням вищерозглянутого способу були виготовлені три порції продукту (LM/186, LM/188 та LM/190).

Дані продукти піддавались наступним випробуванням:

визначення кількості мелатоніну у водній ліпосомній композиції (аналіз за методом рідинної хроматографії високого тиску, HPLC);

визначення розміру ліпосом;

визначення кількості мелатоніну, захопленого ліпосомами.

У наступній таблиці показані параметри, що вимірювались, та їх значущість:

Параметри	Значущість
розмір ліпосом	- стійкість протягом часу складання композиції; - визначення ступеню "злиття" везикул;
кількість мелатоніну	- концентрація мелатоніну у водній ліпосомній композиції; - стійкість протягом часу складання композиції.

Одержані дані наведені у Таблиці 1, яка показує:

концентрація мелатоніну, одержана у водній фармацевтичній композиції, складає (середнє значення з трьох порцій)  $8,05 \times 10^{-3}$ г/мл;

середній розмір ліпосом для трьох порцій дорівнює 93нм;

кількість захопленого ліпосомами мелатоніну, виражена як середнє значення для трьох порцій, дорівнює 80,5мкг/мг;

дані композиції не виявляють явищ агрегації ліпосом.

Таблиця 1

	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір, (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
LM/186	7,8	85	78
LM/188	8,46	97	84,6
LM/190	7,9	98	79

(\*) виражено як кількість (мкг) на мг використаного фосфоліпиду.

Для аналізу за методом HPLC були використані наступні процедури:

нерухома фаза: колонка з оберненою фазою PKB-100 (250x4,6мм; 5мкм Супелко);

рухома фаза: вода:ацетонітрил 80:20 (об'єми. %);

аналіз: 254нм.

Для визначення середнього розміру ліпосом застосовували два типи приладів:

- 1) DELSA 440 Coulter,
- 2) Визначник розмірів частинок типу NICOMP Сабмікрон, модель 370.

Використовувалась наступна методика:

- а) для тестів, що проводились за допомогою приладу 1), 1мл ліпосомної суспензії розводили 10мл водного 0,9% (маса/об'єм) розчину хлориду натрію;
- б) для тестів, що проводились за допомогою приладу 2), 0,5мл розчину а) розводили до 10мл водним 0,9% (маса/об'єм) розчином хлориду натрію.

#### ПРИКЛАД 2

Експерименти проводились згідно з Прикладом 1, розглянутим вище, з використанням 2г фосфоліпиду та 50мг лонідаміну замість 1г фосфоліпиду та 100мг мелатоніну.

У такий спосіб були виготовлені три порції продукту (LM/195, GN/1L та GN/2L). Одержані дані наведені у Таблиці 2, яка показує:

- концентрація лонідаміну у водній композиції змінювалася від величини первинної розчинності  $3 \times 10^{-6}$  г/мл до середнього значення для трьох порцій  $3,83 \times 10^{-3}$  г/мл;
- середній розмір ліпосом для трьох порцій дорівнював 79,6нм;
- кількість захопленого ліпосомами лонідаміну, виражена як середнє значення для трьох порцій, складала 19,2мкг/мг;
- дані композиції не виявляють явищ агрегації ліпосом.

Таблиця 2

Порція	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
LM/195	3,66	103	18,3
GN/1L	3,31	53	16,5
GN/2L	4,54	76	22,7

(\*) Виражено як кількість (мкг) медикаменту на мг використаних фосфоліпідів.

#### ПРИКЛАД 3

Експерименти проводились згідно з Прикладом 1 з використанням 2г фосфоліпиду та 200мг мелатоніну замість 1г фосфоліпиду та 100мг мелатоніну.

Були виготовлені три порції продукту (GN/1M, GN/2M та GN/3M).

Одержані дані наведені у Таблиці 3, яка показує:

- концентрація мелатоніну, одержана у водній ліпосомній композиції, виражена як середнє значення для трьох порцій, складає  $13,5 \times 10^{-3}$  г/мл;
- середній розмір ліпосом для трьох порцій дорівнює 92,6нм;
- кількість захопленого ліпосомами мелатоніну, виражена як середнє значення для трьох порцій, дорівнює 67,6мкг/мг;
- дані композиції не виявляють явищ агрегації ліпосом.

Таблиця 3

Порція	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
GN/1M	10,66	104	53,3
GN/2M	13,90	76	69,5
GN/3M	16,03	98	80,15

(\*) Виражено як кількість (мкг) медикаменту на мг використаних фосфоліпідів.

#### ПРИКЛАД 4

Експерименти проводились згідно з Прикладом 2, за виключенням того, що екструзія проводилась через полікарбонатну мембрану 0,2мкм, а не 0,1мкм.

У такий спосіб були одержані три порції продукту (GN/3L, GN/4L та GN/5L).

Одержані дані наведені у Таблиці 4, яка показує, що підвищення кількості лонідаміну від 20 до 50мг, кількості фосфоліпиду від 1 до 2г та екструзування крізь 0,2мкм замість 0,1мкм мембрану, призводить до значного підвищення концентрації лонідаміну у водній композиції у порівнянні з Прикладом 2. Фактично, для концентрації лонідаміну було одержане середня значення  $4,47 \times 10^{-3}$  г/мл.

Таблиця 4

Порція	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
GN/3L	4,23	134	21,15
GN/4L	4,44	129	22,20
GN/5L	4,75	109	23,75

(\*) Виражено як кількість (мкг) медикаменту на мг використаних фосфоліпідів.

#### ПРИКЛАД 5

20мг циклоспорину-А диспергували у 1г фосфоліпиду при 30°C протягом 10 хвилин з використанням

гомогенізатора типу Ультратуракс™. негайно після цього дану дисперсію суспендували у водному 0,9% (маса/об'єм) розчині хлориду натрію з використанням зазначеного гомогенізатора і потім нагрівали на водяній бані при 65°C протягом 20 хвилин.

Одержану суспензію піддавали наступному циклу охолодження та нагрівання:

охолодження у рідкому азоті протягом 1 хвилини,

нагрівання до 65°C, поки дані фосфоліпіди не ставали цілком рідкими.

Вказаний цикл повторювали 6 разів.

Одержану суспензію пропускали двічі через 0,6мкм фільтр за допомогою апарата Ліпекс Біомембрейн.

Таким чином була одержана суспензія "Мультиламелярних великих везикул" (MLV), котру піддавали 6 циклам безперервної екструзії з використанням 10мл екструдера типу Ліпекс Біомембрейн Термобарел з 0,1мкм полікарбонатними (Костар™) фільтрами при 65°C і гелієм як екструзійним газом, при величині тиску в межах 1000-4800кПа.

У такий спосіб були виготовлені три порції продукту (LM/416A, LM/416B та LM/416C).

Одержані дані наведені у Таблиці 5, яка показує:

концентрація циклоспориноу-А у водній ліпосомній композиції, виражена як середня величина для трьох порцій, складає  $0,96 \times 10^{-3}$  г/мл;

середній розмір ліпосом для трьох порцій дорівнює 103нм;

кількість захопленого ліпосомами циклоспориноу-А, виражена як середнє значення для трьох порцій, складає 9,6мкг/мг;

дані композиції не виявляють явищ агрегації ліпосом.

Таблиця 5

Порція	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
LM/416A	0,96	103	9,6
LM/416B	0,94	99	9,4
LM/416C	0,98	107	9,8

(\*) Виражено як кількість (мкг) медикаменту на мг використаних фосфоліпідів.

#### ПРИКЛАД 6

Експерименти проводились згідно з Прикладом 1 з використанням 2г фосфоліпідів та 50мг біндариту замість 1г фосфоліпідів та 100мг мелатоніну.

У такий спосіб були виготовлені три порції продукту (LM/356, LM/357 та LM/358).

Одержані дані наведені у Таблиці 6, яка показує:

концентрація біндариту у водній композиції змінювалася від величини первинної розчинності  $1 \times 10^{-4}$  г/мл до середнього значення для трьох порцій 4мг/мл;

середній розмір ліпосом для трьох порцій дорівнював 108,3нм;

кількість захопленого ліпосомами біндариту, виражена як середнє значення для трьох порцій, складала 20,2мкг/мг;

дані композиції не виявляють явищ агрегації ліпосом.

Таблиця 6

Порція	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
LM/356	4,1	109,4	20,5
LM/357	4	109,7	20
LM/358	4	106	20

(\*) Виражено як кількість (мкг) медикаменту на мг використаних фосфоліпідів.

#### ПРИКЛАД 7

30мг циклоспориноу-А диспергували у 2г фосфоліпідів при 30°C протягом 10 хвилин з використанням гомогенізатора типу Ультратуракс™. негайно після цього дану дисперсію суспендували у водному 0,9% (маса/об'єм) розчині хлориду натрію з використанням зазначеного гомогенізатора і залишали на 24 години при температурі оточуючого середовища. Потім одержану суспензію нагрівали на водяній бані при 65°C протягом 20 хвилин.

Одержану у такий спосіб суспензію піддавали наступному циклу охолодження та нагрівання:

охолодження у рідкому азоті протягом 1 хвилини,

нагрівання до 65°C, поки дані фосфоліпіди не ставали цілком рідкими.

Даний цикл повторювали 6 разів.

Одержану суспензію пропускали двічі через 0,6мкм фільтр за допомогою апарата Ліпекс Біомембрейн.

Таким чином була одержана суспензія "Мультиламелярних великих везикул" (MLV), котру піддавали 6 циклам безперервної екструзії з використанням 10мл екструдера типу Ліпекс Біомембрейн Термобарел з 0,1мкм полікарбонатними (Костар™) фільтрами при 65°C і гелієм як екструзійним газом, при величині тиску в межах 1000-4800кПа.

У такий спосіб були виготовлені три порції продукту (LM/422a, LM/422b та LM/422c).

Одержані дані наведені у Таблиці 7, яка показує:

концентрація циклоспориноу-А у водній ліпосомній композиції, виражена як середня величина для трьох порцій, складає 3мг/мл;

середній розмір ліпосом для трьох порцій дорівнює 119,5нм;  
кількість захопленого ліпосомами циклоспорину-А, виражена як середнє значення для трьох порцій, складає 15мкг/мг;  
дані композиції не виявляють явищ агрегації ліпосом.

Таблица 7

Порція	Кількість, визнач, методом HPLC, (мг/мл)	Середній розмір (нм)	Кількість, що захоплена, (*мкг/мг)
LM/422a	3,2	121,5	16
LM/422b	3	117,9	15
LM/422c	2,8	119	14

(\*) Виражено як кількість (мкг) медикаменту на мг використаних фосфоліпідів.