



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111762** (13) **C2**
(51) МПК

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2014 07695</p> <p>(22) Дата подання заявки: 08.07.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.06.2016</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 12.01.2016, Бюл.№ 1</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2016, Бюл.№ 11</p>	<p>(72) Винахідник(и): Григор'єва Ганна Савівна (UA), Краснопольський Юрій Михайлович (UA), Конахович Наталія Філімонівна (UA), Пасечнікова Наталія Володимирівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАНОМЕДТРАСТ", вул. Старокиївська, 26, м. Київ, 04116 (UA)</p> <p>(74) Представник: Боровик Петро Антонович, реєстр. №166</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EA 201201593 A1, 30.06.2014 UA 76393 C2, 17.07.2006 Шахмаев А.Е., Краснопольский Ю.М. Получение липосомальных форм гидрофобных антиоксидантов // Вісник НТУ «ХПІ». - 2012. - № 66 (972). - С. 141-157 Jessy Shaji, Sneha Iyer Preparation, optimization and in vivo hepatoprotective evaluation of quercetin liposomes // International Journal of Current Pharmaceutical Research. - 2012. - Vol. 4(2). - P. 24-32 Landi-Librandi A. Paula., Chrysostomo T. N., et all. Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers: in vitro evaluation of human complement activation // Journal of Liposome Research. - 2012. - Vol. 22(2). - P. 89-99</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ЛІПОСОМАЛЬНОГО ЗАСОБУ, ЩО МІСТИТЬ КВЕРЦЕТИН

(57) Реферат:

Винахід належить до способу отримання фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин, шляхом створення суміші етанольних розчинів кверцетину та фосфатиділхоліну, висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії, поетапної фільтрації, стерилізуючої фільтрації та ліофільного висушування, причому розчинення кверцетину здійснюють при кімнатній температурі;

UA 111762 C2

емульгування проводять при температурі 37-42 °С протягом 5-10 хвилин, використовуючи як водне середовище розчин лактози в фосфатному буфері з рН 6,7-7,1, що містить 70-90 % від загальної кількості лактози, диспергування здійснюють протягом чотирьох циклів за поетапного зростання тиску від 300 атм до 1200 атм з контролем розміру часток емульсії, після диспергування до емульсії додатково вводять розчин лактози в фосфатному буфері з рН 6,8-7,1, що містить 10-30 % від загальної кількості лактози, причому кверцетин та лактозу використовують у масовому співвідношенні від 1:(31-80).

Винахід належить до фармацевтики і стосується способу отримання фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин, має поліфункціональну фармакологічну специфіку і може використовуватись для фармакотерапії, зокрема в кардіології та офтальмології.

5 Кверцетин (KB), 3,3', 4', 5, 7-пентаоксифлавонол, належить до флавонолідів, одного із підкласів флавоноїдних сполук. KB має виключно високу антиоксидантну активність, що визначає унікальну поліфункціональність його фармакотерапевтичних проявів: протизапальної, протипухлинної, спазмолітичної, антифібринолітичної, протимікробної дії тощо [1, 2]. Внаслідок
10 притаманному KB широкому спектру терапевтичних властивостей, він є майже ідеальним компонентом лікарських засобів. Тим не менш, створення таких препаратів обмежене вкрай низькою розчинністю KB у водних середовищах. Цим пояснюється відповідне тривале обмеження номенклатури відомих засобів кверцетину лише засобами для перорального застосування, для яких властива низька біодоступність активної субстанції.

15 В той же час, заманлива перспектива якнайширшого клінічного використання політропних властивостей KB обумовила зацікавленість у розробці способів отримання його фармакологічних засобів, що можуть застосовуватись за парентерального та інших шляхів введення.

Відомі способи одержання засобів KB, що передбачають операцію переведення кверцетину в розчинний стан, у присутності полівінілпіролідону [3], його сумішей з натрію тетраборатом та
20 трилоном Б [4, 5] або створення водної суспензії KB, стабілізованої консервантами та харчовими підкислювачами, ароматизаторами, барвниками [6]. Головним недоліком цих способів є їх відтворення у присутності великої кількості нефізіологічних ексципієнтів, а також проведення операції термічної стерилізації [4], що погіршує нешкідливість та стабільність цільових продуктів та їх відповідність різним або сполученим способам введення до організму.

25 Сучасним критеріям створення парентеральних засобів на основі малорозчинних фармакологічно активних субстанцій великою мірою відповідають способи, що забезпечують ліпосомальну організацію цільового продукту [7].

Відомі способи включення KB до ліпосом за участі фосфоліпідів - природних компонентів ліпідного матрикса клітинних мембран. Так, описано способи отримання ліпосомальних засобів
30 KB на основі ліпосом із фосфатидилхоліну (ФХ) або його композиції з фосфатидилетаноламіном або фосфатидилетаноламін дистеаратом в присутності різних варіацій добавок холестерину, гідроксипропіл циклодекстрину, поліетиленгліколю, у т. ч. модифікованого дистеарил-фосфатидилетаноламіном, стеаринової кислоти або гліцерин моностеарату [8-12]. Відомий також спосіб одержання нанопорошку, що містить KB, реалізація
35 якого передбачає залучення т. з. "сурфактанту" (сурогату класичного сурфактанту - природного комплексу поверхнево-активних ліпопротеїдних речовин), за який застосовано варіації ФХ із полочамером, твіном-80, метилцелюлозою, деоксихолатом натрію, поліетиленізованою касторовою олією тощо [13].

40 За певних відмінностей щодо складності та тривалості операцій здійснення зазначених способів (пряме диспергування суміші компонентів або ультразвукова гідратація ліпідної плівки у водному середовищі або застосування емульгатора тощо), їх загальним недоліком є необхідність використання цілої низки переважно нефізіологічних добавок, нестабільність та неоднорідність розмірів і структури часток створеного продукту KB, аж до відсутності його ліпосомальної організації. Зазначені обставини ускладнюють парентеральне застосування та
45 можуть сприяти появі небажаних фізіологічних ефектів [14]. Цим можна пояснити той факт, що внаслідок реалізації згаданих способів цільові продукти KB не позиціонуються як лікарські засоби із доведеною, згідно з нормативними вимогами, високою ефективністю, нешкідливістю та фармацевтичною якістю.

Відомий спосіб отримання ліпосомального засобу, що містить KB, на основі лише
50 фосфатидилхоліну [15]. Цей спосіб забезпечує створення цільового продукту, фармацевтична та фармакотерапевтична якість якого, у сполученні із технологічними операціями його отримання, дозволили запропонувати його як лікарський препарат [16]. Зазначений спосіб вибраний прототипом заявлюваного об'єкта - способу як найбільш близький його аналог за сумою ознак, а саме: природою основних компонентів, залучених до його реалізації, суттю і
55 послідовністю основних операцій та природою і ліпосомальною організацією цільового продукту, що містить KB та має фармакотерапевтичну активність.

Спосіб за прототипом передбачає створення розчину суміші фосфатидилхоліну (ФХ) та кверцетину (KB) в спирті етиловому при співвідношенні ФХ:KB (мас. ч.) 1:(0,01-0,10), висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії з

додаванням лактози у вигляді водного розчину, фільтрацію з послідовним зменшенням розміру пор фільтрів, стерилізуючу фільтрацію з наступним розливом та ліофільним висушуванням.

Тим не менш, спосіб-прототип вимагає дотримання певних умов та проведення операцій, які можуть негативно впливати на відтворення самого способу та якості цільового продукту.

5 По-перше, при реалізації прототипу розчинення КВ проводять при підвищеній температурі, додаючи ФХ до цього нагрітого розчину, що сприяє окисленню субстанцій.

По-друге, емульгування висушеної суміші проводять у воді, без фіксації температури та стабілізації показника рН середовища, що, загалом, не створює умов для фазового переходу фосфоліпиду і може провокувати нерівномірність структури і розподілу заряду ліпідних часток емульсії.

По-третє, передбачене прототипом здійснення операції диспергування емульсії при фіксованому тиску 60 МПа (біля 590 атм) призводить до подовження тривалості самої операції, а надалі - до зростання та неоднорідності розмірів ліпосом. Останнє застереження є дуже важливим з огляду на передбачене парентеральне застосування цільового продукту.

15 По-четверте, у способі-прототипі використано досить вузький діапазон співвідношення кверцетин:лактоза (мас. ч.), а саме - (1-24):(1-30), причому вся лактоза вводиться одночасно на стадії диспергування. Сумарно, ці фактори можуть негативно вплинути як на операцію ліофілізації з огляду на роль лактози як кріопротектора, так і на стабільність цільового продукту в лікарській формі, придатній для фармако-терапевтичного застосування.

20 Зазначені обставини знижують ефективність способу-прототипу щодо процесу його реалізації, а також якості та стабільності цільового продукту - фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин.

Задачею винаходу, що заявляється, є створення способу отримання ліпосомального засобу кверцетину з оптимізованими параметрами операцій, який забезпечує підвищення якості цільового продукту, адекватного різним способам введення до організму, за фармакологічною активністю та стабільністю.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання ліпосомального засобу, що містить кверцетин, який передбачає створення суміші розчинів в етиловому спирті фосфатидилхоліну та кверцетину, висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії, поетапну фільтрацію, стерилізуючу фільтрацію та ліофільне висушування, згідно із винаходом, при створенні суміші розчинів попереднє розчинення кверцетину здійснюють при кімнатній температурі, емульгування проводять при температурі (37-42)°С, використовуючи як водне середовище розчин лактози в фосфатному буфері з рН (6,8-7,1), що містить 70-90 % від загальної кількості лактози, диспергування здійснюють із поетапним зростанням тиску від 300 атм до 1200 атм з контролем розміру часток емульсії, після диспергування до емульсії додатково вводять розчин лактози в фосфатному буфері з рН (6,8-7,1), що містить 30-10 % від загальної кількості лактози, а масове співвідношення кверцетин: лактоза складає від (1:31) до (1:80).

40 Наступними прикладами проілюстровано можливість здійснення способу, що заявляється, а для порівняння - прикладом за способом-прототипом.

Приклад 1 - Заявлюваний об'єкт. Точну наважку 1,25 г КВ у перерахунку на 100 % речовину (наприклад [17-19]) при кімнатній температурі розчиняють у 125 мл спирту етилового при перемішуванні. Точну наважку 42,0 г ФХ (у перерахунку на 100 % речовину, наприклад, [20-21]) при кімнатній температурі розчиняють у 150 мл спирту етилового та додають до зазначеного розчину КВ. Суміш розчинів перемішують протягом 5-7 хв., переносять у до ротаційного випаровувача, та повністю видаляють спирт етиловий у вакуумі при температурі (40-42)°С до отримання плівки. По закінченні процесу висушування у колбу випаровувача протягом 20-25 хв. пропускають інертний газ.

Отриману плівку кількісно знімають зі стінок колби випаровувача при температурі (37-42)°С за допомогою 1,45 л розчину лактози (молочний цукор фармакопейний) у фосфатному буферному розчині рН (6,7-7,1) [22], що містить 50,0 г лактози, при струшуванні при 130-140 об/хв. (наприклад, апарат IKA, Німеччина) та перемішуванні протягом 5-10 хв. до отримання однорідної емульсії.

55 Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску (наприклад, M 110P Microfluidizer Processor, Microfluidics) і піддають диспергуванню при температурі (38-43)°С з поетапним підвищенням тиску від 300 атм до 600 атм і далі - до 900 атм протягом 1-3, 4-8 та 9-10 циклів, відповідно. Диспергування проводять з контролем розміру часток емульсії (наприклад, прилад Malvern Zetasizer Nano 5), який наприкінці процесу не перевищує 180 нм.

60 Після закінчення гомогенізації додають 0,05 л розчину лактози в буферному розчині рН (6,7-7,1), що містить 12,5 г лактози та перемішують. Отриману емульсію послідовно фільтрують на

установці Millipore через мембрани 0,8 мкм, 0,45 мкм і 0,22 мкм, а далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах у скляні флакони.

Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню та проводять ліофільне висушування (наприклад, установка Martin Christ-2-6-D, США). Після висушування флакони із ліофілізованим продуктом продувають інертним газом, закривають і герметизують в асептичних умовах.

У прикладах 2-6 операції та заходи способу, що заявляється, здійснюють відповідно до прикладу 1. Зміни відображено в таблиці 1.

Цільовий продукт є легкою аморфною масою світло-жовтого кольору із лимонним відтінком і характерним запахом.

Приклад 7 - Прототип згідно з [10]. Точну наважку 24 г KB (наприклад, [12, 13]) розчиняють у 2 л спирту етилового при температурі 50 °C і додають до розчину 800 г ФХ (наприклад, [15]) у 2,0 л спирту етилового. Розчин суміші ретельно перемішують і переносять у круглодонну скляну колбу, яку вміщують на ротаційний випаровувач, та видаляють спирт етиловий у вакуумі при температурі 42 °C. По закінченні процесу висушування у колбу протягом 5 хв. пропускають інертний газ.

Отриману ліпідну плівку кількісно знімають зі стінок колби приблизно 3 л води для ін'єкцій та переносять до скляної ємності. Після повного зняття плівки до скляної ємності додають воду для ін'єкцій до загального об'єму рідини 15 л, струшують і перемішують протягом 2-3 год. до отримання однорідної емульсії.

Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску Microfluidizer Processor, Microfluidics, додають 12,6 л води для ін'єкцій і піддають диспергуванню при тиску 60 МПа (592 атм) і температурі (40-45)°C з контролем оптичної густини рідини, що гомогенізується. За досягнення показника оптичної густини 0,15 (довжина хвилі 540 нм; товщина шару поглинання 0,5 см) до отриманої емульсії додають стерильний розчин 480 г лактози (цукор молочний фармакопейний) у 2,4 л води для ін'єкцій. Продовжують диспергування в реакторі гомогенізатора високого тиску до досягнення показника оптичної густини 0,15.

Отриману емульсію послідовно фільтрують на установці Millipore, спочатку через мембрани 0,45 мкм і 0,22 мкм, а далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах у скляні флакони. Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню та проводять ліофільне висушування в установці ТГ-50. Після висушування флакони із ліпосомальним продуктом продувають інертним газом, закривають і герметизують в асептичних умовах.

За результатами відтворення способу-прототипу отримують продукт у вигляді легкої аморфної маси світло-жовтого кольору з лимонним відтінком із характерним запахом.

При ідентифікації та встановленні якості цільових ліпосомальних засобів, що отримані за запропонованим способом і способом-прототипом, їх використовували у вигляді емульсії, відтвореної шляхом додавання у флакони з ліофілізованим продуктом стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду при температурі 37 °C, що відповідає формі їх фармакотерапевтичного застосування.

Ефективність заявлюваного способу за фармацевтичною якістю цільового продукту підтверджена якісною та кількісною ідентифікацією KB і ліпідного компонента ФХ та ліпосомального статусу цільового продукту із застосуванням низки незалежних фізико-хімічних методів, а саме:

- Спектрофотометричним методом за показниками характеристичного поглинання при довжинах хвиль (255-259) нм і (373-377) нм та оптичної густини при довжині хвилі (375±2) нм розчину цільового продукту в етиловому спирті у порівнянні із такими розчинами стандартного зразку кверцетину (ідентифікація та кількісне визначення KB, відповідно);

За буро-зеленим забарвленням, що з'являється при додаванні розчину заліза(III) хлориду до розчину цільового продукту в етиловому спирті (ідентифікація фенольної гідроксильної групи KB);

Методом тонкошарової хроматографії за хроматограмою розчину цільового продукту в етиловому спирті, на якій присутня пляма ФХ жовтого кольору на рівні основної плями стандартного зразку ФХ (ідентифікація ФХ);

Спектрофотометричним методом за показником оптичної густини при довжині хвилі (830±2) нм продуктів кольорової реакції цільового продукту в суміші етилового спирту з водою, обробленого хлорною кислотою, з амонію молібдатом та амідолом у порівнянні із таким стандартним зразком ФХ (кількісне визначення ФХ);

Методом гелі-фільтрації емульсії, відтвореної з ліофілізованого цільового продукту, на колонці із Сефадексом G-25 (елюат-ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду) із контролем

виходу ліпосомального продукту за характеристичним поглинанням при довжині хвилі 540 нм (ідентифікація ліпосом);

За виміром розміру часток в емульсії ліпосомального продукту методом динамічного розсіювання світла (DLS);

5 За показником індексу окислення ліпосомальної фракції цільового продукту у порівнянні із таким стандартного зразку ФХ (визначення стабільності ліпосом);

За параметрами часу утворення, стійкості до розшарування та дисперсного складу емульсії, відтвореної із ліофілізованого цільового продукту (визначення функціональної стабільності та розподілення ліпосом за розмірами);

10 За показниками рН та осмоляльності емульсії (визначення відповідності вимогам функціонального застосування парентеральних та офтальмологічних препаратів).

Згідно із результатами фізико-хімічної ідентифікації (Таблиця 2), спосіб, що заявляється, забезпечує якість та стабільність цільового продукту як ліпосом із фосфатидилхоліну, що містять KB, а саме:

15 За даними методів спектроскопії, тонкошарової хроматографії та хімічного аналізу, у цільовому продукті зберігаються нативний склад та природа KB і ФХ, що збігаються із такими стандартів кверцетину та фосфатидилхоліну;

- KB та ФХ як компоненти цільового продукту за даними гель-фільтрації кількісно включаються до ліпосом;

20 - Для цільового продукту характерно швидке утворення емульсії з ліофілізату та її значна стабільність до розшарування;

- В емульсії цільового продукту сталий розмір 174 ± 2 нм ліпосом супроводжується практичною монодисперсністю їх розподілення за розміром та низьким індексом окислювання;

25 - Значення рН емульсії є сталим та відповідає фізіологічним нормам для цього показника *in vivo*;

- Показник осмоляльності відповідає фармакопейним вимогам. Зазначені характеристичні фактори притаманні цільовому продукту за прикладами 1-3 (таблиця 1), а реалізація заявлюваного способу при відмінних параметрах (приклади 4-6) та за способом-прототипом (приклад 7) обумовлює зниження якості і стабільності цільового продукту:

30 - Зростання розміру ліпосом та неоднорідність їх дисперсності;

- Відносне підвищення індексу окислювання ліпосомального продукту;

- Збільшення часу відтворення емульсії з ліофілізованого продукту, одночасно із зменшенням проміжку часу до її розшарування (при візуальному спостереженні);

- Вихід показника рН емульсії за межу фізіологічно придатних значень.

35 Встановлені переваги якості та стабільності цільового продукту, створеного за прикладами 1-3 (таблиця 1), вдало сполучені із скороченням у часі та певним спрощенням операцій реалізації заявлюваного способу, порівняно із параметрами цих операцій, що передбачені прикладами 4-6 та способом-прототипом (приклад 7):

- Відсутня операція нагрівання при розчиненні KB;

40 - В 10-15 разів скорочено час перемішування після емульгування;

- У 1,5-2 рази скорочено період диспергування при одночасному зменшенні середнього часу, необхідного для фільтрації.

Таким чином, спосіб, що заявляється за прикладами 1-3, забезпечує створення цільового ліпосомального засобу KB, який за фармацевтичною якістю відповідає вимогам до парентеральних препаратів, одночасно із певними технологічними перевагами відтворення цього способу.

Згідно із задачею винаходу, якість цільового продукту - ліпосомального засобу, що містить KB, оцінено за показниками фармакологічної активності в доклінічних дослідженнях при кардіологічній та офтальмологічній патології.

50 Вибрана специфіка випробувань відповідає задачі винаходу, маючи на увазі доказовість фармакологічної якості цільового продукту при різних способах введення.

Порівняння специфічної фармакологічної дії цільових продуктів, отриманих за запропонованим способом (приклади 1-6) і способом-прототипом, проводили в наступних експериментальних моделях:

55 1) субтотальна ішемія та реперфузія міокарда, з оцінкою впливу емульсії ліофілізованого цільового продукту (0,2-0,6 мг/мл) на показники ізольованого серця мурчаків за методикою Лангендорффа;

60 2) травматичний кератит, з оцінкою впливу емульсії цільового продукту в фізіологічному розчині на репарацію рогівки кролів, яким робили інстиляції 0,06 мл емульсії (що містить 18,8 мг/мл ліофілізованого цільового продукту).

Оцінювали також фармакологічну безпеку цільових продуктів, отриманих за запропонованим способом і способом-прототипом. З метою дотримання стандартів GLP та біоетичних норм, що регламентують оптимізацію кількості тварин у доклінічних експериментах, визначення безпечності цільових продуктів проведено для типового прикладу реалізації запропонованого способу (приклад № 1 у Таблиці 1) та для способу-прототипу (приклад № 7) за двох передбачених способів введення.

Застосовані цільові продукти при одноразовому внутрішньовенному введенні у вигляді емульсії та за повторних внутрішньоочеревинних ін'єкцій (14 днів) не викликали загибелі дослідних тварин (білі миші, білі щури), не виявили місцевоподразнювальної дії, негативного впливу на масу тіла та загально-поведінкові реакції, не обумовили змін показників формули крові, біохімічних показників сироватки крові, проявів запальної реакції та дистрофічних змін морфології органів і тканин. При повторних частих інстиляціях (кожні 15 хв. протягом 6 годин) та щоденних 4-разових інстиляціях протягом 28 днів в очі кролів ліпосомальні продукти не виявили місцевоподразнювальної та алергізуючої дії, не чинили негативного впливу на цілісність епітелію рогівки, ригідність ока та стан зовнішніх структур ока.

Таким чином, за показниками гострої та хронічної токсичності, у т. ч. офтальмонешкідливості, що співпадають для обох цільових продуктів, їх слід віднести до практично нешкідливих засобів, що становить підґрунтя їх фармакотерапевтичного застосування.

В таблиці 3 наведено оцінку ефективності способу, що заявляється, за показниками кардіопротекторної активності цільового продукту, а в Таблиці 4 - за динамікою його репараційної та протизапальної дії в офтальмологічному експерименті. Всі продукти в обох застосованих моделях патології покращують показники фізіологічного стану, однак саме реалізація способу, що пропонується, забезпечує якість продукту, яка обумовлює більш високий фармакологічний ефект.

Так, за впливом на функціональну активність серця при ішемії та реперфузії продукти проявляють:

- більш високу антиаритмічну дію, що виявляється у різкому зменшенні кількості екстрасистол, як на тлі ішемії (продукт заявлюваного способу - на 53-59 %; продукт за способом-прототипом - на 45 %), так і реперфузії (продукт заявлюваного способу - на 78 %; продукт за способом-прототипом - на 44 %);

- виразнішу протекторну дію щодо частоти серцевих скорочень на тлі ішемії та динаміки відновлення цього показника після реперфузії;

- нормалізуючий вплив на змінені внаслідок ішемії гемодинамічні характеристики міокарда та їх відновлення при реперфузії.

Слід підкреслити, що продукт реалізації заявлюваного способу є конкурентоспроможним за показниками функціональної активності серця навіть при його застосуванні у менших дозах, порівняно із продуктом за способом-прототипом.

За впливом на характерні показники в моделі травматичного кератиту продукти реалізації способу, що пропонується, обумовлюють:

- активацію та пришвидшену динаміку заживлення травмованого ока (репарація деепітелізованої зони);

- значне зниження проявів запалення.

Результати порівняння фармакологічної активності цільових продуктів при експериментальних патологіях різного генезу не тільки доводять високу якість ліпосомального засобу кверцетину, що вже підтверджена фармацевтичними та фізико-хімічними даними, але й її відповідність отриманню бажаного політропного фармакотерапевтичного ефекту.

Найвища інтегральна якість притаманна продуктам, що створені за запропонованим способом при дотриманні параметрів, які визначені прикладами 1-3 та відмінні від передбачених у способі-прототипі, а саме: розчинення кверцетину здійснюють при кімнатній температурі, емульгування проводять при температурі (37-42)°C, використовуючи як водне середовище розчин лактози в фосфатному буфері з рН (6,8-7,1), що містить (70-90) % від загальної кількості лактози, диспергування здійснюють при поетапному зростанні тиску від 300 атм до 1200 атм з контролем розміру часток емульсії, після диспергування до емульсії додатково вводять розчин лактози в фосфатному буфері з рН (6,8-7,1), що містить (30-10) % від загальної кількості лактози, а масове співвідношення кверцетин: лактоза складає від (1:31) до (1:80). При відхиленні від зазначених параметрів (приклади 4-6 та прототип - приклад 7) реалізація способу пролонгується та дещо ускладнюється (таблиця 1), не зберігається висока якість цільового продукту, ідентифікованого як стабільний ліпосомальний засіб кверцетину, а відповідно - не забезпечується його підвищена фармакологічна активність.

Оптимальне сполучення сприятливої технологічності операцій і процесів із позитивною фізико-хімічною ідентифікацією та даними щодо фармакологічних ефектів та нешкідливості цільового продукту доводить переваги способу, що заявляється, перед способом-прототипом у вирішенні задачі отримання стабільного фармакологічно активного ліпосомального засобу кверцетину. Створений за запропонованим способом продукт за рівнем фармакологічної дії та динамікою її проявів вигідно відрізняється від отриманого за способом-прототипом ліпосомального засобу, що містить КВ.

Зазначене обґрунтовує доцільність використання способу, що пропонується, при створенні ефективного ліпосомального лікарського засобу кверцетину із широкою фармакотерапевтичною специфікою, адекватного різним способам введення до організму.

Таблиця 1

Параметри здійснення процесу отримання ліпосомального засобу, що містить КВ, за способом, який заявляється, та за способом-прототипом

	№ прикладу						
	Спосіб, що заявляється						7 Прото- тип
	1	2	3	4	5	6	
Введене співвідношення ФХ:КВ (мас. ч.)	1:0,030	1:0,020	1:0,060	1:0,030	1:0,050	1:0,060	1:0,030
Температура розчинення КВ:							
- Кімнатна	+	+	+	-	-	+	-
- 50 °C	-	-	-	+	+	-	+
Параметри емульгування:							
а) Середовище:							
- вода	-	-	-	+	-	-	+
- розчин лактози в буфері рН (6,7-7,0)	+	+	+	-	+	+	-
б) Температура, °C	40	42	37	36	44	25	*
б) Час перемішування, хв.	20	35	30	35	35	70	120
в) Кількість введеної лактози (% від загальної)	80	90	70	0	69	91	0
Параметри диспергування:							
а) Тиск при циклах (ат):							
- 1-й - 3-й	300	300	300	600	300	300	~600
- 4-й - 6-й	600	300	600	весь	800	400	весь
- 7-й - 8-й	600	300	900	процес	1000	600	процес
- з 9-го до завершення процесу	900	900	1200		1300	1000	
б) Розмір часток після диспергування, нм	<180	<180	<180	<260	<180	<250	<300*
г) Введення розчину лактози:							
- протягом диспергування	-	-	-	+	-	-	+
- після диспергування	+	+	+	-	+	+	-
д) Кількість введеної лактози (% від загальної)	20	10	30	100	31	9	100
Середній час фільтрації після диспергування (на 1 л), хв.	20	18	30	30	30	30	48
Співвідношення КВ: лактоза (мас. ч.)	1:50	1:30	1:80	1:81	1:24	1:50	1:24

(+) - параметр застосований

(-) - параметр не застосований

(*) - параметр способом-прототипом не регламентується

Таблиця 2

Показники фармацевтичної якості цільового продукту,
отриманого за способом, що заявляється, та за способом-прототипом

	№ прикладу						
	Спосіб, що заявляється						7
	1	2	3	4	5	6	Прототип
Ідентифікація КВ	+	+					+
Ідентифікація ФХ	+	+					+
Співвідношення ФХ: КВ в ліпосомах (мас. ч.): - до гель-фільтрації	1: 0,030	1: 0,020	1: 0,050	1: 0,030	1: 0,050	1: 0,050	1: 0,030
- після гель-фільтрації	1: 0,030	1: 0,020	1: 0,050	1: 0,026	1: 0,048	1: 0,049	1: 0,028
Включення КВ до ліпосом, % (від уведеного)	100	100	100	95	98	99	99
Розмір ліпосом (нм)/ Вміст ліпосом відповідного розміру (%) *	173/95 60/5	176/100	175/94 50/6	193/70 80/30	185/60 90/30 50/10	180/85 50/15	280/72 80/16 50/12
Індекс окислювання	0,25	0,23	0,25	0,31	0,30	0,27	0,30
Час утворення емульсії, хв. *	1,7	1,2	1,5	1,9	2,1	1,8	1,9
Стабільність емульсії до розшарування, хв. *	88	90	72	68	56	70	40
pH емульсії *	6,7	6,6	6,8	6,0	6,2	6,0	5,3
Осмоляльність емульсії, мосмоль/г **	380	320	400	420	330	380	328

(+) - ідентифікація позитивна

* визначається для емульсії, що вперше відтворена з ліофілізованого продукту

** згідно фармакопейних вимог, для офтальмологічних засобів показник осмоляльності має бути в межах 214-434 мосмоль/г

Таблиця 3

Ефективність способу, що пропонується, у порівнянні із способом-прототипом за показниками фармакологічної якості ліпосомального цільового продукту при ішемії та реперфузії ізолюваного серця

Показники фармакологічної якості	№ прикладу (відповідно до таблиці 1)						
	Спосіб, що заявляється						7
	1*	2**	3*	4*	5**	6*	Прототип**
Антиаритмічна дія (кількість екстрасистол/хв.):							
При ішемії (контроль 16,50)***	7,5	6,7	7,8	8,5	7,8	8,5	9,0
При реперфузії (контроль 18,83)***	4,0	4,0	4,2	6,2	6,4	8,6	10,5

Продовження таблиці 3

Зміни частоти серцевих скорочень, удар/хв. (± 5) за тривалості: Ішемії (хв.): 0 40 Реперфузії (хв.) 5 60	150 61 170 160	165 76 170 165	160 60 165 158	155 50 150 160	169 51 153 160	150 65 145 145	158 51 177 190
Зміни тиску у лівому шлуночку серця (% до вихідного) (± 5) за тривалості: Ішемії (хв.): 0 40 Реперфузії (хв.) 5 60	100 25 90 90	100 30 90 95	100 38 85 95	100 22 70 75	100 30 78 80	100 20 80 75	100 20 82 78
Зміни тиску у коронарних судинах (ММНг) за тривалості: Ішемії (хв.): 0 40 Реперфузії (хв.) 5 60	68 15 69 66	70 15 65 70	70 20 60 68	72 10 70 81	70 12 72 80	65 10 70 78	72 10 74 80

* концентрація емульсії продукту в середовищі експерименту - 0,2 мг/мл

** концентрація емульсії продукту в середовищі експерименту - 0,6 мг/мл

*** контроль - без введення продукту

Умови експерименту: субтотальна ішемія (90 % обмеження перфузії), далі - реперфузія (90 %); середовище експерименту - розчин Кребса, тварини - мурчаки масою 400-450 г, по 10 тварин в групі

Таблиця 4

Ефективність способу, що пропонується, у порівнянні із способом-прототипом за показниками фармакологічної якості ліпосомального цільового продукту при експериментальному травматичному кератиті

Об'єкт дослідження - продукт за прикладом	Динаміка показників фармакологічної якості (активність) *					
	Репарація ока: площа деепітелізованої зони, мм ² ($\pm 1,0 \pm 1,8$)			Запальна реакція ока (сума балів**)		
	2 доба	5 доба	8 доба	2 доба	5 доба	8 доба
Продукти реалізації способу, що пропонується, за прикладами:						
1	46,5	6,9	1,3	2,8	2,3	1,4
2	47,0	7,1	1,7	3,8	2,6	1,5
3	45,0	5,7	0	2,1	2,1	0
4	48,0	7,8	2,0	5,0	2,8	1,6
5	48,3	7,4	1,8	5,2	3,0	1,9
6	47,9	7,0	2,0	4,9	2,8	1,8

Продовження таблиці 4

Продукт реалізації способу-прототипу за прикладом:						
7	46,8	7,8	2,1	4,9	2,8	1,9
Контроль***	56,9	40,1	12,4	12,0	20,2	8,4

* в кожній експериментальній групі тварин оцінювали по 8 очей

** показник відповідає сумарній запальній реакції в структурах переднього відділу ока

*** контрольна група тварин з патологією, яким робили інстиляції фізіологічного розчину

Джерела інформації:

1. Bischoff SC. Quercetin: potential in the prevention and therapy of disease //Curr. Opin. Clib. Nutr. Metab. Cure. - 2008. - Vol. 11, N 6, стор. 733-740.
2. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs/GD. Carlo, N. Mascolo, A. Izzo, F. Capasso/ - Life sciences, 1999-Elsevier. - Vol 65, N 4, стор. 333-353.
3. Деклараційний патент України № 38504 А на винахід, МПК⁷ А61К 9/14, А61К 31/79, А61К31/455, опублікований 15.05.2001.
4. Патент РФ № 2181051 на винахід, МПК⁷ А61К 33/22, А61К 9/08, А61К 31/351, А61К 31/79, А61К 31/198, опублікований 10.04.2002.
5. Деклараційний патент України № 34049 А на винахід, МПК А61К 9/08, А61К 31/335, опублікований 15.02.2001.
6. Заявка WO2011019677 А1, МПК (2006.01): А23L 1/00, А23L 1/30, опублікована 17.02.2011.
7. Liposome technology: liposome preparation/ed. G. Gregoriadis. - 2007. - CRC Press, Informa Healthcare. - 324 p.
8. Priprem A., Watanatorn J., Sutthiparinyanout S., Phachonpai W. Anxiety and cognitive effects of Quer liposomes //Nanomedicine: Nanotechn., Biolog. and Medic. - 2008. - Vol. 4, N 1, стор. 70-78.
9. Liposomal QC efficiently suppress grows of solid tumor in murine models //Yuan ZP., Chen LJ., Fan LV at al. - Clin. Cancer Res. - 2006, N 12, стор. 3193-3199.
10. Патент КНР CN 100370968 С, МПК: А61К 31/352; А61К 47/34; А61К 9/127; А61К 9/14; А61Р 29/00; А61Р 35/00; А61Р 39/06; А61Р 9/10, опублікований 27.02.2008.
11. Патент КНР CN 100367953 С, МПК: А61К 31/352; А61К 9/10; А61К 9/127; А61К 9/14; А61Р 29/00; А61Р 35/00; А61Р 37/08; А61Р 39/06; А61Р 7/06, опублікований 13.02.2008.
12. Патент Китаю CN 102058536 А, МПК: А61К 31/352; А61К 47/48; А61К 9/127; А61К 9/19; А61Р 11/00, опублікований 18.05.2011.
13. Патент Китаю CN 101904821 А, МПК: А61К 31/352; А61К 9/16; А61К 9/19; А61К 9/20; А61К 9/48; А61Р 29/00; А61Р 3/06; А61Р 35/00; А61Р 37/08; А61Р 39/06; А61Р 7/02; А61Р 9/10, опублікований 08.12.2010.
14. Albert DS, Garsia DJ /Safety aspects of pegelated liposomal doxorubicine/ Drugs, 1997; 54 Suppl. 4:30-5.
15. Патент України № 76393, МПК (2006) А61К 9/127, А61К 31/353 (2006.01), А61К 47/44, А61Р 31/06 (2006.01), А61Р 31/00, А61Р 35/00, опублікований 17.07.2006.
16. Ліпофлавоно. РП UA № 3053/01/05 від 07.04.05.
17. Кверцетин, PVP Sociedade Anonima, Бразилія.
18. Кверцетин, РП UA № Р.08.03/07178, Україна.
19. Кверцетин, Alfa Aesar GmbH & CoKG, Німеччина.
20. Фосфатидилхолін, Лецитин-стандарт РП UA/13014/01/01 від 03.07.2013.
21. Фосфатидилхолін, Lipoid E PS S, Німеччина.
22. Державна Фармакопея України, 1-е видання. - 2001 - Харків. - 531 с.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- Спосіб отримання фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин, шляхом створення суміші етанольних розчинів кверцетину та фосфатидилхоліну, висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії, поетапної фільтрації, стерилізуючої фільтрації та ліофільного висушування, який **відрізняється** тим, що розчинення кверцетину здійснюють при кімнатній температурі; емульгування проводять при температурі 37-42 °С протягом 5-10 хвилин, використовуючи як водне середовище розчин лактози в фосфатному буфері з рН 6,7-7,1, що містить 70-90 % від загальної кількості лактози, диспергування здійснюють протягом чотирьох циклів за поетапного зростання тиску від 300 атм

до 1200 атм з контролем розміру часток емульсії, після диспергування до емульсії додатково вводять розчин лактози в фосфатному буфері з рН 6,8-7,1, що містить 10-30 % від загальної кількості лактози, причому кверцетин та лактозу використовують у масовому співвідношенні від 1:(31-80).

5

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601