



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91702** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)**B01F 3/00****B01F 3/08** (2006.01)**B01F 3/20** (2006.01)**B01F 3/22** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ****(21)** Номер заявки: **u 2014 01941****(22)** Дата подання заявки: **26.02.2014****(24)** Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.07.2014****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2014, Бюл.№ 13****(72)** Винахідник(и):**Шахмаєв Антон Євгенович (UA),
Горбач Тетяна Вікторівна (UA),
Краснопольський Юрій Михайлович (UA)****(73)** Власник(и):**Шахмаєв Антон Євгенович,
вул. Матюшенко, 7, кв. 55, м. Харків, 61013
(UA),
Горбач Тетяна Вікторівна,
вул. Дружби Народів, 205, кв. 17, м. Харків,
61184 (UA),
Краснопольський Юрій Михайлович,
вул. Чайковського, 12, кв. 22, м. Харків,
61024 (UA)****(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КАРДІОПРОТЕКТОРНОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ НАНОЧАСТИНОК****(57)** Реферат:

Спосіб одержання ліпосомального препарату з фармакологічною дією включає етапи, на яких розчин природного фосфатидилхоліну в етиловому спирті висушують у вакуумі, емульгують у водному середовищі, диспергують емульсію, додають лактозу у вигляді водного розчину в процесі диспергування, стерилізуючої фільтрації через каскад фільтрів та ліофільно висушують. Суміш розчину природного фосфатидилхоліну та дипальмітоїлфосфатидилгліцерину у співвідношенні (1:0,1-0,12) та убіхінону в етиловому спирті при масовому співвідношенні фосфоліпідів: убіхінон (1:0,1-0,2) висушують у вакуумі. Масовий вміст лактози в емульсії ліпосом складає від 70,0 мг/мл до 80,0 мг/мл.

UA 91702 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до способу одержання кардіопротекторного та антиоксидантного засобу, що може використовуватися для лікування серцево-судинних захворювань (ССЗ), а також в інших напрямках медицини. В основу засобу входять природні фосфоліпіди, з яких складається ліпосомальна наночастинка, та убіхінон (Q_{10}), який знаходиться у бішарі ліпосоми.

При лікуванні ССЗ та інших напрямів медицини актуальним є застосування гідрофобних антиоксидантів для нормалізації процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та відновлення структури біологічних мембран клітин. Відомо, що з цілого ряду антиоксидантів, Q_{10} перевершує всі інші природні антиоксиданти і тому вважається найбільш перспективним для застосування в клінічній практиці [1]. Крім того, відомо, що Q_{10} є коферментом, який синтезується в організмі людини, проте з віком його концентрація істотно знижується [7], через що зростає ризик розвитку ССЗ.

Однак, застосування Q_{10} в медичній практиці обмежено через його низьку біодоступність, що, насамперед, пов'язано з його гідрофобними властивостями. На нашу думку збільшити біодоступність Q_{10} можливо, створивши водорозчинну ін'єкційну форму даного препарату, що представляє безперечний інтерес для кардіології (нестабільна і стабільна стенокардія, міокардит) та інших захворювань, наприклад, в офтальмології (запальні захворювання очей, поранення та післяопераційні рани, кератити). На нашу думку, включення Q_{10} в ліпосомальні наноконтейнери, в мембрані яких буде знаходитися гідрофобна субстанція Q_{10} , є досить перспективним, оскільки дозволить створити водорозчинну форму Q_{10} .

Крім того, створення препаратів на основі ліпосомальних наночастинок є одним з перспективних напрямків сучасної фармації. Ліпосоми мають ряд безсумнівних переваг: захищають клітини організму від токсичної дії лікарських речовин; пролонгують дію введеного в організм лікарського препарату; захищають лікарські речовини від деградації; сприяють прояву націленої специфічності за рахунок селективного проникнення з крові в тканини, що призводить до виборчої їх концентрації в зоні осередку ураження; змінюють фармакокінетику лікарських препаратів, підвищуючи їх фармакологічну ефективність; дозволяють створити водорозчинну форму ряду гідрофобних лікарських субстанцій, збільшуючи тим самим їх біодоступність [2]. Для виготовлення ліпосомальної форми препаратів використовується як ліпосомотворюючі компоненти природні та синтетичні фосфатидилхоліни. Використання фосфатидилхолінів виправдано ще й тому, що вони характеризуються як високою мембранопротекторною активністю, так і антиоксидантною дією.

Відомо ряд препаратів кардіопротекторної дії на основі убіхінонів, які застосовуються як при пероральному введенні, так і у вигляді ін'єкційних розчинів. Так, наприклад, у Росії відомий препарат "Кудесан" у вигляді крапель 3 % та "Кудесан" Форте у вигляді розчину виробництва компанії "Аквіон". "Кудесан" у вигляді крапель 3 %, містить Q_{10} , α -токоферолу ацетат, аскорбіл пальмітат, макрогону гліцерилгідроксистеарат (кремофор RH-40), натрію бензоат, лимонну кислоту (харчову), воду очищену. "Кудесан" Форте відрізняється від "Кудесану" крапель 3 % тим, що в ньому міститься вдвічі більше Q_{10} . Даний засіб має ряд недоліків: є біологічно активною добавкою, має низький кардіопротекторний ефект, низьку антиоксидантну активність, приймається per os.

Відомі також засоби Liquid Q LiQsorb Liposomal CoQ10 Drops та Liquid QH Liposomal Ubiquinol CoQ10 виробництва Tishcon Corp. До складу Liquid Q LiQsorb Liposomal CoQ10 Drops входить: убіхінон, альфа-токоферол, вода очищена, тригліцериди із середнім ланцюгом, соєвий лецитин, полісорбат 80, лимонна кислота, сорбат калію. До складу Liquid QH Liposomal Ubiquinol CoQ10 входить: убіхінон, вода очищена, тригліцериди із середнім ланцюгом, соєвий лецитин, полісорбат 80, аскорбіл пальмітат, аскорбінова кислота, лимонна кислота, сорбат калію і альфа-токоферол.

Дані засоби мають ряд недоліків: є біологічно активними добавками, не є лікарськими засобами, мають низький кардіопротекторний ефект, нестабільність фізико-хімічних властивостей в процесі зберігання (високий індекс окислення, високий вміст лізопродуктів); приймаються per os, що значно знижує біодоступність Q_{10} та потребує прийому великої кількості продукту.

Найбільш близьким до засобу, одержаного за способом згідно з корисною моделлю, є антигіпоксичний препарат, що характеризується кардіопротекторною дією [8]. Препарат випускається в Україні під назвою "Ліпін". Сьогодні препарат рекомендований для лікування гострого інфаркту міокарда та нестабільної стенокардії [2]. Застосування препарату "Ліпін" в ранньому періоді інфаркту міокарда значно знижує ризик розвитку небезпечних порушень ритму шлуночка, підвищує ефективність і безпеку лікування найбільш важкої категорії хворих. Ліпін знижує процеси ПОЛ, підтримує активність антиоксидантних систем організму, проявляє

мембранопротекторну дію. У хворих, яким для зменшення негативної дії реперфузії вводився "Ліпін", не було відзначено порушень ритму серця, проявів серцевої недостатності, випадків розвитку аневризми. Використання препарату може дозволити підвищити ефективність лікування та безпеку тромболітичної терапії у хворих похилого віку [2, 4]. Механізм

антигіпоксичної дії ліпосом може бути обумовлений тим, що фосфоліпіди ліпосом є конкурентним субстратом для фосфоліпаз та продуцентів продуктів перекисного окислення. При цьому фосфоліпіди м'язових клітин залишаються неушкодженими. Ймовірно, існує певна тропність фосфатидилхолінових ліпосом до ішемічної тканини. Таким чином, запропоновано використовувати Ліпін як кардіопротектор при лікуванні інфаркту міокарда.

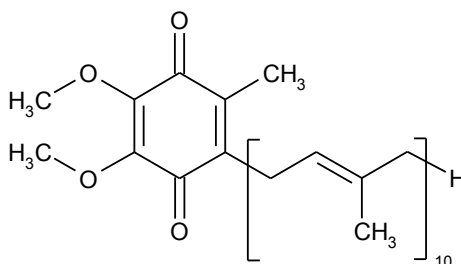
Однак даний препарат має ряд істотних недоліків: фармакологічна та антиоксидантна активність заснована тільки на властивостях фосфатидилхоліну і не може повністю забезпечити захисний ефект серцевого м'яза людини; термін придатності продукту 1 рік, що пов'язано з процесами ПОЛ, які відбуваються в препараті, що також обмежує його застосування. Одним з істотних недоліків препарату є низький вміст у ньому кріопротектора, що, в свою чергу, не дозволяє зберегти розмір ліпосом в нанодіапазоні при заморожуванні та ліофілізації. Зазначені обставини знижують ефективність засобу з відомого рівня техніки як для способу його одержання, так і його стабільності та якості - ліпосомального препарату з фармакологічними властивостями.

В основу корисної моделі поставлена задача забезпечення такого способу одержання кардіопротекторного засобу на основі природних фосфоліпідів та Q_{10} , взятих в певному співвідношенні, в якому забезпечується високий мембранопротекторний та антиоксидантний ефект. Ліпосомальна форма Q_{10} дозволить підвищити його біодоступність за рахунок ін'єкційного введення. Крім того, присутність в препараті фосфатидилхоліну підвищує антиоксидантну та мембранопротекторну властивості, що особливо важливо для відновлення біологічних мембран.

Поставлена задача вирішується тим, що забезпечується спосіб одержання ліпосомального препарату з фармакологічною дією, що включає етапи, на яких розчин природного фосфатидилхоліну в етиловому спирті висушують у вакуумі з одержанням ліпідної плівки, одержану ліпідну плівку емульгують у водному середовищі з одержанням емульсії, диспергують

вказану емульсію, причому в ході диспергування додають лактозу у вигляді водного розчину, одержану дисперговану емульсію піддають стерилізуючій фільтрації через каскад фільтрів з одержанням ліпосомального препарату, після чого вказаний ліпосомальний препарат ліофільно висушують, який відрізняється тим, що перед висушуванням у вакуумі до розчину природного фосфатидилхоліну додають розчин дипальмітоїлфосфатидилгліцерину у співвідношенні 1:0,1-0,12 та убіхінон в етиловому спирті при масовому співвідношенні (фосфатидилхолін+дипальмітоїлфосфатидилгліцерин):убіхінон 1:0,1-0,2, а масовий вміст лактози в емульсії ліпосом складає від 70,0 мг/мл до 80,0 мг/мл.

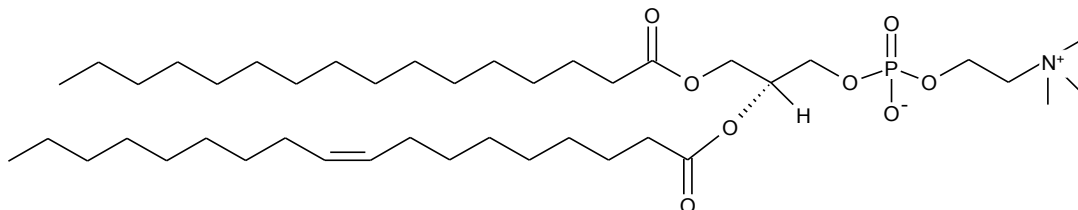
Убіхінон (Q_{10}) - природна речовина, що є вітаміноподібним коферментом (формула 1)



Формула 1 - Убіхінон (Q_{10}). Він належить до надзвичайно поширених коферментів, присутніх у всіх живих клітинах тварин, рослин, грибів та мікроорганізмів. Q_{10} - ендogenousний субстрат, бере участь у переносі електронів у транспортному ланцюжку окислювально-відновних процесів, в процесі обміну енергії, в реакції окислювального фосфорилування в дихальному ланцюжку мітохондрій клітин. Бере участь у процесах клітинного дихання, збільшуючи синтез АТФ. Надає клінічно значиму антиоксидантну дію, а також відновлює антиоксидантну активність вітаміну Е - α -токоферолу. Захищає ліпіди клітинних мембран від процесів ПОЛ. Скорочує зону пошкодження міокарда в умовах ішемії. Q_{10} перешкоджає подовженню інтервалу QT, покращує переносимість фізичних навантажень. Q_{10} розчинний у діетиловому ефірі, дуже слабозчинний в етанолі, практично не розчиняється у воді. Повільно розкладається і змінює колір під дією кисню, УФ- або денного світла.

Як мембраноутворюючий фосфоліпід використовується фосфатидилхолін. При цьому фосфатидилхолін містить 90-98 мас. % основної речовини.

Як відомо, фосфатидилхолін (формула 2) - ефіри холіну та дигліцеридфосфатних кислот, одна з основних фракцій фосфоліпідів. Молекули фосфатидилхолінів утворені залишками гліцеролу, жирних кислот (головним чином стеаринової, пальмітинової, олеїнової та лінолевої) і холіну



Формула 2 - Фосфатидилхолін

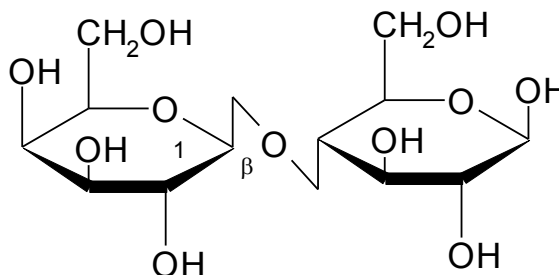
Поряд з негативно зарядженою фосфатною групою у фосфатидилхоліні знаходиться позитивно заряджений атом нітрогену. За рахунок врівноваження зарядів їх молекули в цілому нейтральні. Фосфатидилхоліни - гігроскопічні воскоподібні поверхнево-активні речовини, добре розчинні у спиртах, діетиловому та петролейному етерах, нерозчинні в ацетоні. Широко представлені в організмах тварин (в усіх органах і тканинах), яйцях птахів, а також у рослинах (найбільше у насінні сої та соняшника).

Фосфатидилхоліни в організмі беруть участь в утворенні біологічних мембран. Фосфатидилхоліни використовуються в складі фармацевтичних засобів для запобігання розвитку захворювань печінки, серцево-судинної системи, нервової тканини. Вони мають мембранопротекторні властивості. Значимість препаратів, що містять фосфатидилхолін, визначається роллю останнього в біологічних мембранах: інгібуванням процесів ПОЛ; прискоренням регенерації пошкоджених клітинних мембран, наприклад, використанням фосфоліпідів як "будівельний" матеріал для пошкоджених органів. Фосфатидилхолін (лецитин) добре відомий компонент багатьох ін'єкційних лікарських препаратів: "Фосфоглів" (Фармстандарт, Росія), "Ессенціале форте Н" (Sanofi Aventis), "Ліпостабіл" (Aventis Pharma, Франція), "Ліпофундин" (Braun Melsungen, Німеччина), "Інтраліпід" (Fresenius Kabi, Австрія/Німеччина). У препаратах для парентерального харчування входить яєчний фосфатидилхолін [2]. Стаття, присвячена яєчним фосфоліпідам, описана в USP.

Фосфатидилхолін утворює штучні мембрани (ліпосоми), в які вбудовуються гідрофобні сполуки, зокрема, убіхінони.

До складу препарату введена лактоза, яка визначає стабільність ліпосоми при ліофілізації, виконуючи роль кріопротектора. Лактоза використовується для виробництва різних фармацевтичних препаратів: розчинів для ін'єкцій та інфузій, таблеток, капсул та ін.

Лактоза - вуглевод групи дисахаридів, міститься в молоці і молочних продуктах (формула 3)

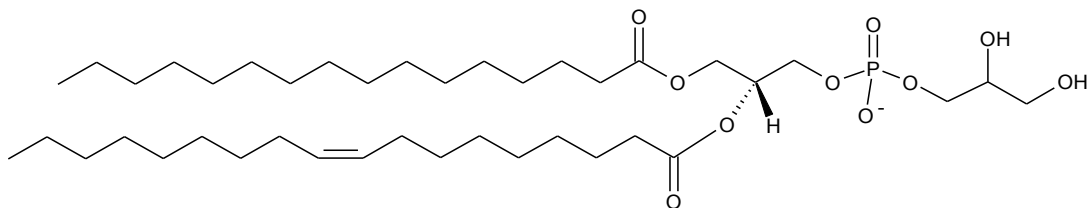


Формула 3 - Лактоза

Молекула лактози складається із залишків молекул глюкози і галактози. З хімічної точки зору лактоза належить до класу відновлювальних вуглеводів, які здатні віддавати електрони з розривом власного кисневого зв'язку. Лактоза міститься в багатьох ліках. Вона використовується як наповнювач, щоб придати консистенцію субстанції для таблетування в більш ніж 20 % ліків, а також використовується як кріопротектор.

Фосфатидилгліцерини (формула 4) - одні з основних фосфоліпідів рослин та водоростей (до 60 % по масі від усіх фосфоліпідів у хлоропластах), а також більшості бактерій (до 70 % від усіх фосфоліпідів); в тканинах тварин - зазвичай міnorний фосфоліпід, який міститься в основному в мітохондріях, наприклад, в серцевому м'язі

5



Формула 4 - Фосфатидилгліцерин

Таким чином, до складу кардіопротекторного засобу входять природні фосфоліпіди, Q₁₀, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин - компоненти, які забезпечують високий мембранопротекторний та антиоксидантний ефект.

10

У варіанті здійснення способу одержання кардіопротекторного засобу, що заявляється, спосіб включає наступні етапи, на яких:

Зважають фосфатидилхолін, дипальмітоїлфосфатидилгліцерин та Q₁₀. Сировину завантажують в ємність і в неї з мірника доливають етиловий спирт. Суміш перемішують протягом 2 годин при кімнатній температурі до повного розчинення сировини. Суміш компонентів в етиловому спирті фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм та концентрують у вакуумі при певній температурі до повного випарювання етанолу, а потім залишкові кількості розчинника випаровуються в струмі азоту. Одержану в результаті цього тонку ліпідну плівку гідратують у водному розчині або в розчині лактози на водяній бані при температурі 40-42 °С до одержання гомогенної суспензії. Гомогенізацію проводять шляхом проведення екструзії на установці типу "Microfluidics-110" при тиску 800 атм при температурі 38-43 °С. Даний режим дозволяє отримати ліпосоми стандартного складу, основна маса яких представлена частинками з розміром 120-160 нм (80-90 % всіх ліпосом) до ліофілізації та (140-180 нм) після ліофілізації. Критичними параметрами є температура, тиск у гомогенізаторі, кількість проведених циклів. Потім проводять стерилізуючу фільтрацію через фільтри з діаметром пор 0,8/0,22 мкм. Емульсію розливають у флакони і проводять ліофілізацію з подальшою герметизацією в атмосфері інертного газу. Як кріопротектор використовують лактозу при різних співвідношеннях фосфоліпіди:кріопротектор. Одержані стерильні ліофілізовані зразки ліпосомального убіхінону розчиняють в стерильному водному розчиннику. Препарат представляє гомогенну емульсію біло-жовтого кольору.

15

20

25

30

Усі інгредієнти, що використовують для одержання кардіопротекторного засобу, дозволені до застосування у складі лікарських препаратів:

- фосфатидилхолін - (яєчний); (USP)
- дипальмітоїлфосфатидилгліцерин; (USP)
- убіхінон (Q₁₀); (USP)
- лактоза; (USP, Ph Eur, ДФУ).

35

На підставі проведених досліджень визначені та обґрунтовані оптимальні значення характеристик, що забезпечують досягнення технічного результату (табл. 1-7).

Спочатку нами були складені модельні основи, що містять різні ліпіди, які потім були використані при одержанні ліпосомальних зразків. Основним фактором, що може пошкоджувати структуру ліпиду є процес гомогенізації при високому тиску, що супроводжується підвищенням температури, аерацією водної емульсії, наявністю тиску. Нами вивчено вплив зазначених чинників на фізико-хімічні та біологічні властивості фосфоліпідів. Ми використовували фосфатидилхолін концентрацією від 10 мг/мл до 30 мг/мл, виділений з трьох природних джерел: яєчного жовтка, сої та соняшнику, а також синтетичні фосфатидилхоліни: дипальмітоїлфосфатидилхолін (ДПФХ) та диміристоїлфосфатидилхолін (ДМФХ). Зазначені ліпіди найбільш часто використовуються в складі ліпосомальних лікарських препаратів [2]. Ми використовували наступні умови гомогенізації ліпідних емульсій: температура гомогенізації від 40 °С до 50 °С, гомогенізацію проводили протягом 10 циклів при 1200 атм. Одержані дані наведено в табл. 1.

50

Таблица 1

Вивчення впливу гомогенізації на властивості фосфоліпідів

Тип фосфоліпиду (ФЛ)	Концентрація ФЛ в емульсії мг/мл	Індекс окислення Вихідний/після обробки	Стабільність емульсії ліпосом у вигляді рідини	Гемолітична активність емульсії in vitro Вихідний/після обробки
Яєчний ФХ	10-30	0,19/0,25	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
Соевий ФХ		0,35/0,48	Стабільна - не менше 2 годин	+
ФХ з соняшника		0,5/0,68	Не стабільна	++
ДПФХ		0,15/0,17	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
ДМФХ		0,12/0,14	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
Яєчний ФХ +ДМФХ (1:1)		0,16/0,19	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
Яєчний ФХ +ДПФХ (1:1)		0,18/0,2	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
ДПФХ+ДМФХ (1:1)		0,14/0,14	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності

Примітка +++++ - повний гемоліз; +++ 50 % - гемоліз; ++ 25 % гемоліз; + - початкова стадія гемолізу.

Дані, наведені в табл. 1, дозволяють використовувати для подальшої роботи зазначені ліпіди за винятком фосфатидилхоліну, виділеного з сої та соняшнику. При їх використанні виявлені гемолітичні властивості, причому гемолітичну активність мали не тільки зразки після гомогенізації, а й емульсії, одержані без гомогенізації з вихідного фосфатидилхоліну сої та соняшнику. Можливо це пов'язано з високим вмістом в продукті лізоформ. Крім того, у соєвого фосфатидилхоліну високий індекс окислення (0,35/0,48), що свідчить про окислення жирних кислот фосфоліпідів. Нами також встановлена гемолітична активність продукту з фосфатидилхоліну соняшнику. Крім того, використання даного фосфоліпиду не дозволяє отримати стабільні ліпосомальні емульсії. Інші використані фосфоліпіди та їх суміші продемонстрували властивості, що дозволяють використовувати їх у складі ліпосом.

У наступній групі експериментів нами вивчено включення убіхінону в ліпосомальні емульсії на основі фосфатидилхоліну. Використовували вихідне співвідношення фосфоліпиди:убіхінон 9:1 (табл. 2), оскільки у попередніх експериментах нами виявлено, що оптимальним є вміст у продукті убіхінону 10 % відносно вмісту фосфоліпідного компонента.

Таблиця 2

Залежність включення убіхінону від структури використовуваного фосфатидилхоліну

Тип фосфоліпиду (ФЛ)	Включення убіхінону в ліпосому, %	Індекс окислення	Стабільність емульсії ліпосом у вигляді рідини	Гемолітична активність емульсії in vitro після обробки
Яєчний ФХ	64,0	0,22	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
ДПФХ	67,4	0,17	Стабільна - не менше 1,5 годин	Відсутність активності
ДМФХ	65,7	0,14	Стабільна - не менше 1 години	Відсутність активності
Яєчний ФХ +ДМФХ (1:1)	63,5	0,19	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
Яєчний ФХ +ДПФХ (1:1)	67,2	0,2	Стабільна - не менше 2 годин	Відсутність активності
ДПФХ+ДМФХ (1:1)	66,0	0,14	Стабільна - не менше 1 години	Відсутність активності

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що синтетичні фосфатидилхоліни утворюють менш стабільні ліпосоми порівняно з яєчним фосфатидилхоліном, що може бути обумовлено більш високою температурою фазового переходу у синтетичних ліпідів. Ступінь включення Q_{10} в ліпосоми практично однакова. Індекс окислення збільшився до 0,22 (при вихідному 0,19), що дещо менше, ніж у раніше одержаних дослідах, табл. 1. Це може бути пов'язано з антиоксидантними властивостями Q_{10} . Тому в подальших експериментах та при розробці препарату нами використовувався фосфатидилхолін яєчного жовтка.

В результаті проведених досліджень встановлено, що оптимальними умовами для одержання гомогенної стабільної емульсії є співвідношення Q_{10} (1-2): фосфатидилхолін (8-10): дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (1-2) при температурі 38-43 °C, рН емульсії 6,5-7,0. Емульсія, яка одержана при зазначених параметрах, була стабільна і не розшаровувалася протягом від 2 до 4 годин.

Використання ліпосом зазначеного розміру (120-160 нм (80-90 % всіх ліпосом) до ліофілізації та (140-180 нм) після ліофілізації) як лікарського засобу для внутрішньовенного введення можливо у зв'язку з їх розміром, низьким ступенем окислення і відсутністю продуктів гідролізу. Введення до складу ліпосом кислих фосфоліпідів, наприклад, дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, призводило до підвищення включення Q_{10} .

Нами виявлено, що збільшення кількості циклів або величини тиску призводить до нестабільності ліпосом, збільшення їх розмірів або злиття. Контроль процесу гомогенізації ми оцінювали за розміром ліпосом, і при збільшенні цього параметра процес слід припиняти. При одержанні ліпосомальної форми Q_{10} препаратів нами використовувався тиск 800 атм, кількість циклів не більше 5. Далі, нами проведено дослідження з вивчення впливу розміру ліпосом та їх заряду на ступінь включення субстанції. Виявлено, що на стабільність ліпосом і включення Q_{10} до їх складу впливає іонна сила, величина рН, температура проведення технологічного процесу, заряд та розмір ліпосом (табл. 3). Крім того, самостійне значення має стабільність самого лікарського засобу на основі Q_{10} , що включається до ліпосом.

Таблиця 3

Залежність фізико-хімічних властивостей ліпосом, що містять убіхінон, від умов одержання

Характеристика Ліпосом	Q ₁₀ :ФХ 1:9	Q ₁₀ :ФХ 2:8	Q ₁₀ :ФХ:ДПФГ 1:9:1	Q ₁₀ :ФХ: ДПФГ 1:8:2
включення Q ₁₀ в ліпосому при 800 атм та 5 циклах, мг/мл	0,65	0,64	0,86	0,84
включення Q ₁₀ в ліпосому при 800 атм та 7 циклах, мг/мл	0,42	0,46	0,52	0,5
розмір ліпосом, які містять Q ₁₀ , при 800 атм та 5 циклах, нм	120-180	120-200	100-160	100-140
розмір ліпосом, які містять Q ₁₀ , при 800 атм та 7 циклах, нм	80-150	100-150	60-120	50-120
включення Q ₁₀ в ліпосому при 800 атм, 5 циклах та температурі 38-43 °С, мг/мл	0,67	0,64	0,88	0,83
включення Q ₁₀ в ліпосому при 800 атм, 5 циклах та температурі 45-50 °С мг/мл	0,60	0,56	0,70	0,73
Індекс окислення при 800 атм, 5 циклах та температурі 38-43 °С	0,31-0,35	0,32-0,35	0,33-0,37	0,34-0,39
Індекс окислення при 800 атм, 5 циклах та температурі 45-50 °С	0,44-0,5	0,42-0,52	0,46-0,57	0,45-0,57

Як видно з наведених у таблиці 3 даних, включення в ліпідний бішар Q₁₀ при використанні співвідношень Q₁₀:фосфатидилхолін (1:9) та Q₁₀:фосфатидилхолін (2:8) не відрізнялося, що свідчить про максимальну насиченість антиоксидантом мембрани ліпосом. Однак, нами виявлено, що включення в ліпосоми дипальмітоїлфосфатидилгліцерину дозволило збільшити включення Q₁₀ в ліпосомі на 30 %. Оптимальна кількість циклів, що дозволяє отримати ліпосомі в нанодіапазоні становить не більше 5. При цьому одержано наночастинки з розміром до 200 нм, що дозволяє проводити стерилізуючу фільтрацію через мембрани 0,22 мкм. Збільшення кількості циклів, хоча і призводить до зменшення розмірів ліпосом, знижує включення Q₁₀ в мембрану. Визначено температуру гомогенізації емульсії 38-43 °С, при якій індекс окислення практично не відрізняється від індексу окислення вихідної суміші ліпідів. Підвищення температури до 45-50 °С призводить до підвищення індексу окислення ліпідів практично в два рази.

Таким чином, до складу препарату введений негативно заряджений фосфоліпід - дипальмітоїлфосфатидилгліцерин. Його присутність дозволяє, по-перше, збільшити включення Q₁₀ в мембрану ліпосом, по-друге, підвищує стабільність ліпосомальної емульсії. Крім того,

дипальмітоїлфосфатидилгліцерин поліпшує фільтрування емульсії через мембрани з порами розміром 0,22 мкм.

Стабілізуюча речовина - кріопротектор для ліпосомального препарату - у кожному конкретному випадку має бути визначена експериментальним шляхом. Для ліпосомальних препаратів найкращі результати одержані при використанні сполук вуглеводної природи - цукрів.

З метою вивчення впливу введення цукрів у ліпідну емульсію на ступінь включення Q_{10} в ліпідну мембрану проведена наступна група експериментів (табл. 4). Нами використані три кріопротектори: лактоза, трегалоза, сахароза, які найбільш часто використовуються при ліофілізації наноструктур. Цукри використовувалися в різних концентраціях від 20 до 80 мг/мл.

Таблиця 4

Вплив різних цукрів на включення Q_{10} на різних стадіях

Найменування цукру	Введення цукру при регідратації плівки	Включення Q_{10} , %	Введення цукру при гомогенізації	Включення Q_{10} , %
Сахароза	Від 20 до 80 мг/мл	48-57	Від 20 до 80 мг/мл	60-64
Трегалоза	Від 20 до 80 мг/мл	55-60	Від 20 до 80 мг/мл	65-70
Лактоза	Від 20 до 80 мг/мл	55-58	Від 20 до 80 мг/мл	65-70

Цукри вводили як на першому етапі, при гідратації ліпідної плівки водним розчинником, так і між 3 та 4 циклами. Цукри вводили у формі концентрованих стерильних розчинів. Виявлено, що введення досліджуваних розчинів цукрів на стадії гідратації призводить до зниження включення Q_{10} до складу ліпосом. Додавання розчинів цукрів (лактози та трегалози) у процесі гомогенізації приводить до включення Q_{10} в ліпосоми до 65-70 %. Таким чином, кріопротектори вуглеводної природи (наприклад, лактоза або трегалоза) можуть на першому етапі призвести до небажаної зміни розміру ліпосом та знизити включення до них лікарської активної фармакологічної субстанції. При цьому особливу увагу потрібно приділяти досягненню необхідного розміру ліпосом та виключенню їх агрегації. Враховуючи, що сахароза дає дещо менше включення Q_{10} в ліпосоми, надалі ми використовували як кріопротектор лактозу (тому що трегалоза на відміну від лактози не описана в фармакопеях України, Європи, США та ін., як наслідок, ми не використовували розчини трегалози в нашій роботі). Таким чином, основним критерієм підбору кріопротекторів є збереження ліпосоною стабільних розмірів при дегідратації мембран ліпосом.

Для визначення оптимальної концентрації лактози в препараті проведені експерименти, в яких додавання розчину лактози до складу емульсії ліпосом проводили між 3 та 4 циклами гомогенізації до кінцевої концентрації цукру 20, 40 та 80 мг/мл (табл. 5).

Таблиця 5

Вплив концентрації лактози на стабільність нанорозмірів ліпосом

Концентрація лактози, мг/мл	Включення Q_{10} в ліпосоми до ліофілізації, %	Розмір ліпосом до ліофілізації, нм	Включення Q_{10} в ліпосоми після ліофілізації, %	Розмір ліпосом після ліофілізації, нм
20,0	68-73	130-180	58-62	175-240
40,0	66-70	130-180	60-66	170-230
80,0	65-70	130-180	65-68	140-180

Як видно з таблиці 5, використання різних концентрацій лактози призводить до одержання близьких розмірів ліпосом до ліофілізації. У той же час після проведення процесу ліофілізації препаратів збереження розмірів наночастинок у нанодіапазоні спостерігається тільки при концентрації кріопротектора (лактози) у кінцевій концентрації 80 мг/мл.

Після формування ліпосом, що містять лікарський препарат, виникає необхідність поділу суміші, яка складається з "вільного" препарату і "навантажених" ліпосом. Після одержання ліпосомальної емульсії на основі Q_{10} перед нами стояло завдання відділення не включеної в ліпосоми субстанції. Враховуючи гідрофобні властивості Q_{10} , нами використані два методи: центрифугування емульсії (при 10 тис. об./хв. і температурі 6-10 °С) з метою осадження нерозчинного у воді Q_{10} та відділення його за допомогою фільтрації через мембрани з розміром

пор 0,45 мкм або 0,22 мкм. Використовуючи обидва методи, вдається відділити вільну форму Q_{10} . Для підтвердження повноти видалення "вільного" Q_{10} було проведено визначення вмісту речовини в ліпосомальній емульсії, а також в осаді, одержаному при центрифугуванні та в розчині, одержаному при змиві з фільтра органічним розчинником (табл. 6).

5

Таблиця 6

Результати видалення "вільного" убіхінону з ліпосомальної емульсії (*)

Метод видалення "вільного" Q_{10}	Об'єм емульсії (мл) та кількість Q_{10} (мг)	Вміст ліпосомального Q_{10} в емульсії (мг)	Вміст "вільного" Q_{10} (мг)	Всього Q_{10} (мг)
Центрифугування емульсії	100 мл/100 мг	84,5	16,0	100,5
Фільтрація емульсії	100 мл/100 мг	82,6	17,2	99,8

* наведені середні дані з трьох експериментів

Як видно з наведених даних (табл. 6), центрифугування та мембранна фільтрація призводять до близьких результатів: вміст "вільного" Q_{10} становить 16-17,2 % від доданого в емульсію Q_{10} . Нами для подальших досліджень використовувалася фільтрація через мембранні фільтри. Останнє пов'язано з тим, що центрифугування призводить до додаткової технологічної стадії та необхідності в промисловому обладнанні. Фільтрація є необхідною стадією при одержанні стерильного препарату. Тому був введений каскад фільтрів (0,8 мкм, 0,45 мкм та 0,22 мкм) для видалення "вільного" Q_{10} та одержання стерильної емульсії ліпосом. Необхідно відзначити, що вказана фільтрація дозволяє так само проводити стандартизацію препарату ліпосом, відокремлюючи крім "вільного" Q_{10} незначну кількість більших ліпосомальних частинок. Дані, одержані нами, свідчать, що втрати ліпосом складають не більше 0,5-0,7 % (визначення проводили за вмістом ліпідного фосфору у вихідній емульсії та емульсії, що пройшла стерилізуючу фільтрацію).

Після проведення досліджень, до складу препарату була введена лактоза (ДФУ, USP, Ph Eur), яка визначає стабільність ліпосом при ліофілізації, виконуючи роль кріопротектора. Одержаний ліпосомальний препарат на основі Q_{10} являє собою наноемульсію з розміром частинок 140-180 нм. Після ліофілізації, завдяки лактозі, препарат зберігає нанорозміри.

У таблиці 7 наведені характеристики ліпосомальних зразків Q_{10} до та після ліофілізації.

Таблиця 7

Характеристика ліпосомальних зразків Q_{10} до та після ліофілізації

Q_{10} мг/мл	% ДПФГ в ЛС	ФХ мг/мл	Лактоза мг/мл	Включення Q_{10} в ЛС, %	Розмір ЛС, нм до ліофілізації	Включення Q_{10} в ЛС, % п/ліофілізації	Розмір ЛС, нм п/ліофілізації
1,0	10,0	10,0	80,0	80-85	130-160	80-85	140-180
1,0	10,0	10,0	70,0	80-85	130-160	80-85	140-180
1,0	10,0	10,0	85,0	80-85	130-160	80-85	140-180
1,0	10,0	10,0	60,0	80-85	130-160	80-82	165-210

Як видно з таблиці 7, оптимальний вміст кріопротектора лактози в суміші знаходиться в межах від 70 мг/мл до 80 мг/мл. Зниження вмісту лактози (менше 70 мг/мл) в емульсії призводило до збільшення розміру наночастинок після ліофілізації 165-210 нм. Підвищення вмісту лактози (85 мг/мл) не приводило до стабілізації розмірів ліпосом, в порівнянні з 80 мг/мл лактози в емульсії.

Можливість здійснення способу, який заявляється, ілюструється наступними прикладами, а для порівняння - прикладом за способом-прототипу.

Приклад 1

Зважають компоненти на об'єм препарату - 1 літр емульсії: 9 грам фосфатидилхоліну, 0,9 грам дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, 1,0 грам Q_{10} , 70 грам лактози. Фосфатидилхолін та дипальмітоїлфосфатидилгліцерин розчиняють в 200 мл етанолу. Суміш перемішують до повного розчинення при температурі 30-35 °С. До розчину додають Q_{10} та суміш перемішують

при кімнатній температурі до повного розчинення. Суміш гідрофобних компонентів в етанолі фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Одержаний стерильний розчин концентрують на вакуумному роторному випарнику при температурі 37-40 °С до повного видалення етанолу, а потім ліпідну плівку обробляють газоподібним азотом. Одержану ліпідну

5

плівку гідратують водою для ін'єкцій в об'ємі 0,8 літра. Проводять перемішування емульсії до повного видалення плівки та одержання гомогенної емульсії.

80 грам лактози розчиняють у воді для ін'єкцій при температурі 50-60 °С. Розчин доводять до кінцевого об'єму 0,2 л. Розчин лактози фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм.

10

Одержану гомогенну емульсію диспергують на установці "Microfluidics-110" при тиску 800 атм і температурі 38-43 °С. Проводять 5 циклів гомогенізації. Між 3 та 4 циклами додають стерильний розчин лактози. Кінцевий об'єм після гомогенізації складає 1,0 літр. Одержують гомогенну емульсію з розміром частинок 130-160 нм. Потім одержану емульсію фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Вміст Q_{10} в 1 мл складає 0,835 мг (з урахуванням включення). Емульсію розливають по 24 мл (20 мг) у флакони та проводять ліофілізацію з

15

подальшою герметизацією в атмосфері інертного газу. Одержані стерильні ліофілізовані зразки ліпосомального Q_{10} розчиняють в стерильному водному розчиннику. Препарат являє собою гомогенну емульсію білого-жовтого кольору. Одержаний препарат містить у флаконі 20 мг Q_{10} . Співвідношення фосфоліпиди: Q_{10} складає 1:0,1. Співвідношення між фосфатидилхоліном:дипальмітоїлфосфатидилгліцерином складає 1:0,1. Вміст лактози в

20

емульсії складає 70 мг/мл. Розмір наночастинок після ліофілізації складає 153,6 нм (98,25 %). Індекс окислення складає 0,33. Включення Q_{10} в ліпосоми 83,5 %.

Приклад 2

Зважують компоненти на об'єм препарату - 1 літр емульсії: 9 грам фосфатидилхоліну, 1,35 грама дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, 1,148 грама Q_{10} , 75 грам лактози. Фосфатидилхолін та дипальмітоїлфосфатидилгліцерин розчиняють в 250 мл етанолу. Суміш перемішують до

25

повного розчинення при температурі 30-35 °С. До розчину додають Q_{10} і суміш перемішують при кімнатній температурі до повного розчинення. Суміш гідрофобних компонентів в етанолі фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Одержаний стерильний розчин концентрують на вакуумному роторному випарнику при температурі 37-40 °С до повного

30

видалення етанолу, а потім ліпідну плівку обробляють газоподібним азотом. Одержану ліпідну плівку гідратують водою для ін'єкцій в об'ємі 0,8 літра. Проводять перемішування емульсії до повного видалення плівки та одержання гомогенної емульсії.

75 грам лактози розчиняють у воді для ін'єкцій при температурі 50-60 °С. Розчин доводять до кінцевого об'єму 0,2 л. Розчин лактози фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм.

35

Одержану гомогенну емульсію диспергують на установці "Microfluidics-110" при тиску 800 атм і температурі 38-43 °С. Проводять 5 циклів гомогенізації. Між 3 та 4 циклами додають стерильний розчин лактози. Кінцевий об'єм після гомогенізації складає 1,0 літр. Одержують гомогенну емульсію з розміром частинок 130-160 нм. Потім одержану емульсію фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Вміст Q_{10} в 1 мл складає 0,976 мг (з урахуванням включення). Емульсію розливають по 21,0 мл (20 мг) у флакони та проводять ліофілізацію з

40

подальшою герметизацією в атмосфері інертного газу. Одержані стерильні ліофілізовані зразки ліпосомального Q_{10} розчиняють в стерильному водному розчиннику. Препарат представляє гомогенну емульсію біло-жовтого кольору. Одержаний препарат містить у флаконі 20 мг Q_{10} . Співвідношення фосфоліпиди: Q_{10} складає 1:0,11. Співвідношення фосфатидилхолін:дипальмітоїлфосфатидилгліцерин складає 1:0,15. Вміст лактози в емульсії

45

складає 75 мг/мл. Розмір наночастинок після ліофілізації складає 147,3 нм (96,7 %). Індекс окислення складає 0,35. Включення Q_{10} в ліпосоми складає 85,0 %.

Приклад 3

Зважують компоненти на об'єм препарату - 1 літр емульсії: 9 грам фосфатидилхоліну, 1,8 грам дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, 1,3 грама Q_{10} , 80 грам лактози. Фосфатидилхолін та дипальмітоїлфосфатидилгліцерин розчиняють в 200 мл етанолу. Суміш перемішують до

50

повного розчинення при температурі 30-35 °С. До розчину додають Q_{10} та суміш перемішують при кімнатній температурі до повного розчинення. Суміш гідрофобних компонентів в етанолі фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Одержаний стерильний розчин концентрують на вакуумному роторному випарнику при температурі 37-40 °С до повного

55

видалення етанолу, а потім ліпідну плівку обробляють газоподібним азотом. Одержану ліпідну плівку гідратують водою для ін'єкцій в об'ємі 0,8 літра. Проводять перемішування емульсії до повного видалення плівки та одержання гомогенної емульсії.

80 грам лактози розчиняють у воді для ін'єкцій при температурі 50-60 °С. Розчин доводять до кінцевого об'єму 0,2 л. Розчин лактози фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм.

60

Одержану гомогенну емульсію диспергують на установці "Microfluidics-110" при тиску 800 атм та температурі 38-43 °С. Проводять 5 циклів гомогенізації. Між 3 та 4 циклами додають стерильний розчин лактози. Кінцевий об'єм після гомогенізації складає 1,0 літр. Одержують гомогенну емульсію з розміром наночастинок 130-150 нм. Потім одержану емульсію фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Вміст Q_{10} в 1 мл складає 1,089 мг (з урахуванням включення). Емульсію розливають по 18,5 мл (20 мг) у флакони та проводять ліофілізацію з подальшою герметизацією в атмосфері інертного газу. Одержані стерильні ліофілізовані зразки ліпосомального Q_{10} розчиняють в стерильному водному розчиннику. Препарат представляє гомогенну емульсію біло-жовтого кольору. Одержаний препарат містить у флаконі 20 мг Q_{10} .
 Співвідношення фосфоліпіди: Q_{10} складає 1:0,12. Співвідношення фосфатидилхолін:дипальмітоїлфосфатидилгліцерин складає 1:0,2. Вміст лактози в емульсії складає 80 мг/мл. Розмір наночастинок після ліофілізації 153,6 нм (95,5 %). Індекс окислення складає 0,33. Включення Q_{10} в ліпосоми складає 83,8 %.

Приклад 4

Зважують компоненти на об'єм препарату - 1 літр емульсії: 9 грам фосфатидилхоліну, 2,5 грама дипальмітоїлфосфатидилгліцерину, 1,2 грама Q_{10} , 60 грам лактози. Фосфатидилхолін та дипальмітоїлфосфатидилгліцерин розчиняють в 200 мл етанолу. Суміш перемішують до повного розчинення при температурі 30-35 °С. До розчину додають Q_{10} та суміш перемішують при кімнатній температурі до повного розчинення. Суміш гідрофобних компонентів в етанолі фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Одержаний стерильний розчин концентрують на вакуумному роторному випарнику при температурі 37-40 °С до повного видалення етанолу, а потім ліпідну плівку обробляють газоподібним азотом. Одержану ліпідну плівку гідратують водою для ін'єкцій в об'ємі 0,8 літра. Проводять перемішування емульсії до повного видалення плівки та одержання гомогенної емульсії.

80 грам лактози розчиняють у воді для ін'єкцій при температурі 50-60 °С. Розчин доводять до кінцевого об'єму 0,2 л. Розчин лактози фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм.

Одержану гомогенну емульсію диспергують на установці "Microfluidics-110" при тиску 800 атм та температурі 38-43 °С. Проводять 5 циклів гомогенізації. Між 3 та 4 циклами додають стерильний розчин лактози. Кінцевий об'єм після гомогенізації складає 1,0 літр. Одержують гомогенну емульсію з розміром частинок 130-160 нм. Потім одержану емульсію фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Вміст Q_{10} в 1 мл складає 0,678 мг. Емульсію розливають по 30 мл (20 мг) у флакони та проводять ліофілізацію з подальшою герметизацією в атмосфері інертного газу. Одержані стерильні ліофілізовані зразки ліпосомального Q_{10} розчиняють в стерильному водному розчиннику. Препарат представляє являє собою гомогенну емульсію біло-жовтого кольору. Одержаний препарат містить у флаконі 20 мг Q_{10} .
 Співвідношення фосфоліпіди: Q_{10} складає 1:0,13. Співвідношення фосфатидилхолін:дипальмітоїлфосфатидилгліцерин складає 1:0,27. Вміст лактози в емульсії складає 60 мг/мл. Розмір наночастинок після ліофілізації складає 200,8 нм (88,25 %). Індекс окислення складає 0,33. Включення Q_{10} в ліпосоми складає 56,5 %.

Як видно з наведених даних, порушення встановлених співвідношень призводить до низького включення Q_{10} в ліпосоми (збільшена кількість дипальмітоїлфосфатидилгліцерина та Q_{10}), збільшення розмірів наночастинок при ліофілізації (зниження концентрації кріопротектора - лактози в емульсії).

Приклад 5 (За способом-прототипом)

Зважують компоненти на об'єм препарату - 1 літр емульсії: 25 грам фосфатидилхоліну, 25 грам лактози. Фосфатидилхолін розчиняють в 200 мл етанолу. Суміш перемішують до повного розчинення при температурі 30-35 °С. Розчин фосфатидилхоліну в етанолі фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Одержаний стерильний розчин концентрують на вакуумному роторному випарнику при температурі 37-40 °С до повного видалення етанолу, а потім ліпідну плівку обробляють газоподібним азотом. Одержану ліпідну плівку гідратують водою для ін'єкцій в об'ємі 0,8 літра. Проводять перемішування емульсії до повного видалення плівки та одержання гомогенної емульсії.

25 грам лактози розчиняють у воді для ін'єкцій при температурі 50-60 °С. Розчин доводять до кінцевого об'єму 0,2 л. Розчин лактози фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм.

Одержану гомогенну емульсію диспергують на установці "Microfluidics-110" при тиску 800 атм та температурі 38-43 °С. Проводять 8 циклів гомогенізації. Між 7 та 8 циклами додають стерильний розчин лактози. Кінцевий об'єм після гомогенізації складає 1,0 літр. Одержують гомогенну емульсію з розміром наночастинок 150-160 нм. Потім одержану емульсію фільтрують через мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Емульсію розливають по 20 мл у флакони та проводять ліофілізацію з подальшою герметизацією в атмосфері інертного газу. Одержані

стерильні ліофілізовані зразки ліпосомального препарату розчиняють в стерильному водному розчиннику. Препарат представляє собою гомогенну емульсію біло-жовтого кольору. Вміст лактози в емульсії складає 25 мг/мл. Розмір наночастинок після ліофілізації складає 212,5 нм (90,25 %). Індекс окислення складає 0,46.

Ефективність використання кардіопротекторного засобу, одержаним за способом, що заявляється, досліджувалась на тваринах (пацюках) в умовах інфаркту міокарда та ішемічної хвороби серця (ІХС) згідно з рекомендаціями [5, 6]. Всі маніпуляції, що призводили до болю, проводили під гексеналовим наркозом (60 мг/кг підшкірно), відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та інших наукових цілей [3].

Моделювання інфаркту міокарда робили шляхом одноразового внутрішньочеревного введення 0,25 мл 0,18 % розчину адреналіну гідрохлориду. Препарат вводили: а) одноразово, за 30 хв. до початку експерименту в дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно, б) щоденно протягом 5 днів після моделювання в дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно. ПОЛ оцінювали за вмістом ТБК - активних продуктів - малонового діальдегіду (МДА) та дієнових кон'югатів (ДК). Активність антиоксидантної системи (АОС) оцінювали за загальною антиоксидантною активністю (ЗАА). Також визначали вміст ізопростан-8 - маркера окисного стресу.

Моделювання ІХС робили за методом, описаним Гаман Л.В.: щодня протягом 7 днів підшкірно вводили 0,1 мл 0,1 % розчину адреналіну гідрохлориду і 1 мл 2,5 % емульсії гідрокортизону ацетату. Препарат вводили щодня протягом 5 днів після моделювання в дозі 10 мг/кг, внутрішньовенно.

Фармакологічна активність кардіопротекторного засобу, одержаного за способом, що заявляється, підтверджується відповідними експериментами. Дані наведені в таблиці 8.

Таблиця 8

Результати дослідження антиоксидантної активності кардіопротекторного засобу, одержаного за способом, що заявляється, на моделі інфаркту міокарда (сироватка крові)

Група	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	Ізопростан-8, нг/мл	ЗАА (%)
Контроль, n=8	52,34±2,02	2,45±0,21	5,42±0,34	57,48±3,11
Інфаркт, n=8	92,14±6,34 ¹	6,59±0,32 ¹	12,58±1,02 ¹	45,38±2,18 ¹
Введення препарату, 5 днів n=8	60,48±3,11 P<0,05 P ₁ <0,001	3,00±0,25 P>0,05 P ₁ <0,001	5,00±0,37 P>0,05 P ₁ <0,001	60,49±3,02 P>0,05 P ₁ <0,001
Введення препарату порівняння*, 5 днів n=8	76,64±1,72 P ₁ <0,001	5,05±0,23 P ₁ <0,001	9,12±0,28 P ₁ <0,001	50,78±3,06 P ₁ <0,001
Одноразове введення n=8	81,25±3,11 P ₁ <0,01	5,42±0,32 P ₁ <0,02	7,48±0,66 P ₁ <0,01	59,32±2,11 P ₁ <0,02
Одноразове введення препарату порівняння*, n=6	87,04±2,0 P ₁ <0,01	6,15±0,18 P ₁ <0,01	10,92±0,30 P ₁ <0,01	48,28±2,89 P ₁ <0,01

1 - p<0,001P - достовірність відмінностей з контролем;

P₁ - достовірність відмінностей з інфарктом;

* - як препарат порівняння використовували препарат, одержаний за прикладом 5
ЗАА виражена у відсотках (%) інгібування; 50 % інгібування - 1 од. активності

З даних, наведених у табл. 8, видно, що кардіопротекторний засіб, одержаний за способом, що заявляється, сприятливо впливає на ТБК-активні продукти - ДК, МДА, ізопростан-8, які є маркерами ПОЛ та які свідчать про інтенсивність протікання інфаркту міокарда. Так, після введення препарату при моделі інфаркту міокарда кількість ДК знизилася майже у 1,5 рази, кількість МДА знизилася у 2 рази, кількість ізопростану-8 знизилася у 2,5 рази, загальна антиоксидантна активність підвищилася у 1,3 рази.

Про сприятливу дію кардіопротекторного засобу також свідчать результати при моделюванні ішемічної хвороби серця (табл. 9, 10).

Таблиця 9

Результати дослідження антиоксидантної активності кардіопротекторного засобу, одержаного за способом, що заявляється, на моделі ІХС (сироватка крові)

Група	ДК	МДА	Ізопростан	ЗАА
Контрольна група, n=8	52,34±2,02	2,45±0,21	5,42±0,34	57,48±3,11
ІХС, n=8	76,48±3,05 P<0,001	4,93±0,31 P<0,001	9,78±0,55 P<0,001	44,85±2,11 P<0,001
Препарат 5 днів, n=8	61,22±4,17 P<0,01 P ₁ <0,001	3,37±0,28 P<0,01 P ₁ <0,02	6,00±0,34 P>0,05 P ₁ <0,01	52,88±1,84 P<0,05 P ₁ <0,01

Таблиця 10

Результати дослідження антиоксидантної активності кардіопротекторного засобу, одержаного за способом, що заявляється, на моделі ІХС (серцевий м'яз)

Група	ДК	МДА	ЗАА
Контроль, n=8	1,78±0,12	0,325±0,008	63,23±3,11
ІХС, n=8	3,47±0,18 P<0,001	0,489±0,007 P<0,01	53,23±2,77 P<0,01
Препарат, 5 днів, n=8	2,03±0,11 P>0,05 P ₁ <0,01	0,332±0,008 P>0,05 P ₁ <0,01	65,33±4,13 P>0,05 P ₁ <0,01

Таким чином, можна побачити, що кардіопротекторний засіб, одержаний за способом, що заявляється, має виражений антиоксидантний та мембранопротекторний ефект, який знижує кількість ТБК-активних продуктів ПОЛ та підвищує загальну антиоксидантну активність.

Все перераховане робить спосіб, який заявляється, реальною основою для одержання ефективного сучасного ліпосомального препарату для терапії патології серцевого м'язу.

Переваги запропонованого способу перед способом за прототипом наведені в таблиці 11

Таблиця 11

Переваги запропонованого способу перед способом за прототипом

Найменування показників	Запропонованим способом	За способом прототипу
ДК, мкмоль/л Контроль (52,34±2,02) Інфаркт (92,14±6,34)	60,48±3,11 (5 днів введення) 81,25±3,11 (1 день введення)	76,64±1,72 (5 днів введення) 87,04±2,0 (1 день введення)
МДА, мкмоль/л Контроль (2,45±0,21) Інфаркт (6,59±0,32)	3,00±0,25 (5 днів введення) 5,42±0,32 (1 день введення)	5,05±0,23 (5 днів введення) 6,15±0,18 (1 день введення)
Розмір ліпосом після ліофілізації, нм	140-180 нм	180-210 нм
Кількість лактози, мг/мл	70-80	20-25
Кількість циклів диспергування	5	8-10
Індекс окислення	0,31-0,37	0,45-0,5
Термін зберігання, роки	2	1
Стабільність емульсії після розчинення у воді, години	Не менше 4	Не менше 2

Як видно з даних, наведених у таблиці 11, одержаний продукт перевершує за показниками якості та фармакологічну активність продукту, одержаного за способом за прототипом. Так введення до складу препарату кріопротектора в зазначеній кількості дозволяє стабілізувати розміри ліпосом та зберегти їх при ліофілізації. Введення до складу препарату дипальмітоїлфосфатидилгліцерину дозволяє стабілізувати продукт, надати ліпосомі негативний заряд, що сприяє меншій кількості циклів диспергування.

Це, в свою чергу, знижує тривалість способу одержання ліпосом та зменшує індекс окислення ліпосомального препарату, сприяє збільшенню включення Q_{10} в бішар ліпосом. Стабільність препарату забезпечує також Q_{10} , що забезпечує можливість збільшення терміну зберігання до 2 років. Введення до складу ліпосом антиоксиданту Q_{10} дозволило створити продукт з високою кардіопротекторною та антиоксидантною активністю. Крім того, продукт стає водорозчинним, що підвищує його біодоступність.

Посилання:

1. Lipophilic Antioxidants in Human Serum and Aging / Passi S., de Pita O., Puddu P., Littarru G.P. // Free Radical Research. - 2002. - V. 36, № 4. - P. 471-477.

2. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине. / Ю.М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Шве́ц // Харьков: Издательский центр НТУ "ХПИ", 2011. - 227 с.

3. Кушкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / Кушкун А.А. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 800 с.

4. Безкаравайный Б.А. Препараты природного фосфатидилхолина: перспективы и применение в педиатрии / Б.А. Безкаравайный, М.И. Когутницкая. - Журнал Здоровье ребенка. 2007. Том 6. № 9. - С. 26-31.

5. Денисов В.М. Биохимия миокарда, поврежденного адреналином / В.М. Денисов, С.М. Рукавишникова, В.И. Жуков. - Харьков: Оригинал, 1999. - 184 с.

6. Особенности морфофункциональной ультраструктуры сердца при экспериментальной ишемии миокарда / Гаман Л.В., Кононенко М.И., Тюбка Т.Ю. // Укр. Биофармацевтический журнал, 2011. - Т. 10, № 5. - С. 16-20.

7. Mitochondrial bioenergetics in aging / Lenaz G., D'Aurelio M., Merlo Pich M. [et al.] // Biochim. Biophys. Acta-2000. - V. 1459, № 2-3. - P. 397-404.

8. Стефанов А.В., Теміров Ю.П., Краснопольський Ю.М. Спосіб одержання ліпосомального препарату. Патент України № 5654 Заявлен. 14.03.93. А61К9/127; Видан 28.12.94. Бюл. № 7-1; 4 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання ліпосомального препарату з фармакологічною дією, що включає етапи, на яких розчин природного фосфатидилхоліну в етиловому спирті висушують у вакуумі з одержанням ліпідної плівки, одержану ліпідну плівку емульгують у водному середовищі з одержанням емульсії, диспергують вказану емульсію, причому в ході диспергування додають лактозу у вигляді водного розчину, одержану дисперговану емульсію піддають стерилізуючій фільтрації через каскад фільтрів з одержанням ліпосомального препарату, після чого вказаний ліпосомальний препарат ліофільно висушують, який **відрізняється** тим, що перед висушуванням у вакуумі до розчину природного фосфатидилхоліну додають розчин дипальмітоїлфосфатидилгліцерину у співвідношенні 1:0,1-0,12 та убіхінон в етиловому спирті при масовому співвідношенні (фосфатидилхолін+дипальмітоїлфосфатидилгліцерин):убіхінон 1:0,1-0,2, а масовий вміст лактози в емульсії ліпосом складає від 70,0 мг/мл до 80,0 мг/мл.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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

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