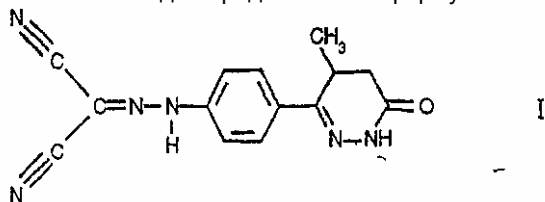


Даний винахід стосується пероральних фармацевтичних композицій, які під контролем вивільняють левозимендан, зі зниженою частотою розвитку небажаних ефектів. Левозимендан, або (-)-[4-(1,4,5,6-тетрагідро-4-метил-6-оксо-3-піридазиніл)феніл]гідразоно]пропандинітрил, застосовний для лікування застійної серцевої недостатності.

Передумови винаходу

Левозимендан, який представляє (-)-енантіомер [4-(1,4,5,6-тетрагідро-4-метил-6-оксо-3-піридазиніл)][феніл][гідразоно]пропандинітрилу, і спосіб його одержання описані в Європейському патенті 565546 В1. Левозимендан ефективний при лікуванні серцевої недостатності і характеризується сильним кальційзалежним зв'язуванням з тропоніном.

Левозимендан представлений формулою:



Вплив левозимендану на кровообіг людини описаний в Sundberg, S. et al., Am. J. Cardiol., 1995; 75: 1061-1066. Фармакокінетика левозимендану після внутрішньовенного і перорального введення людини описана в Sandell, E.-P. et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., 26 (Suppl. 1), S57-S62, 1995. Застосування левозимендану для лікування ішемії міокарда описане в WO 93/21921. Клінічні дослідження підтвердили позитивну дію левозимендану у хворих серцевою недостатністю.

Відомо, що пероральне введення левозимендану зв'язане з труднощами, особливо якщо метою є створення терапевтичного ефекту протягом тривалого періоду часу. По-перше, час напіввиведення левозимендану з організму людини малий, приблизний 1 години. Отже, при використанні традиційних пероральних композицій негайного вивільнення левозимендан доводиться приймати часто протягом дня. По-друге, левозимендан характеризується швидким всмоктуванням з шлунково-кишкового тракту. Отже, при використанні традиційних пероральних композицій негайного вивільнення в плазмі швидко і різко досягаються максимальні концентрації левозимендану, як правило, протягом 1 години. Високі концентрації левозимендану в плазмі сприяють збільшенню частоти серцевих скорочень, що є небажаним ефектом для хворих серцевою недостатністю.

Пероральні композиції тривалої дії дають безліч переваг в порівнянні з традиційними пероральними композиціями швидкого вивільнення. Такими перевагами є менші перепади концентрації лікарського засобу в плазмі і, як результат, стійкий терапевтичний ефект, знижена частота введення і зменшення побічних ефектів. Як правило, композиції тривалої дії готують шляхом змішування лікарського засобу, засобу, контролюючого вивільнення, і можливих наповнювачів і пресування суміші в матриксні таблетки. Типові композиції тривалої дії вивільняють лікарський засіб як у верхніх, так і в нижніх відділах шлунково-кишкового тракту.

Спроби вводити левозимендан у вигляді традиційних препаратів тривалої дії були незадовільними. При введенні левозимендану у вигляді препаратів тривалої дії, які традиційно використовуються в даній області для надання терапевтичного ефекту протягом тривалого періоду часу, часто спостерігаються небажані ефекти, такі як сильний головний біль, більш часте серцебиття і підвищена частота серцевих скорочень. Таким чином, існує потреба в нових способах і композиціях для перорального введення левозимендану, зокрема, в способах і композиціях, які забезпечують терапевтичний ефект левозимендану протягом тривалого періоду часу і які дозволяють уникнути недоліків, властивих традиційним препаратам левозимендану тривалої дії.

Суть винаходу

Було з'ясовано, що в нижніх відділах шлунково-кишкового тракту, зокрема, в товстому кишечнику, левозимендан зазнає метаболізму бактеріями, що заселяють кишечник. Даний метаболічний шлях в результаті приводить до утворення активного метаболіту, (R)-N-[4-(1,4,5,6-тетрагідро-4-метил-6-оксо-3-піридазиніл)феніл]ацетаміду (II), що характеризується істотно більшим часом напіввиведення, ніж такий для левозимендану. Було встановлено, що накопичення активного метаболіту було причиною розвитку небажаних ефектів, пов'язаних з препаратами левозимендану тривалої дії. Виявлення активного метаболіту і шляхи його утворення зробило можливим розробку препаратів вивільнення, що контролюється, які демонструють меншу частоту розвитку небажаних ефектів і які добре підходять для лікування хворих серцевою недостатністю.

Таким чином, метою даного винаходу є забезпечення пероральних композицій, зокрема композицій, які забезпечують терапевтичний ефект протягом тривалого періоду часу, з яких левозимендан вивільняється поступово і, переважно, по суті, повністю до того, як досягне нижніх відділів шлунково-кишкового тракту, зокрема товстого кишечника, таким чином, що утворення активного метаболіту залишається на низькому рівні.

Таким чином, концентрація активного метаболіту в плазмі пацієнта залишається на досить низькому рівні, щоб уникнути небажаних ефектів, що викликаються накопиченням активного метаболіту, в той час, як терапевтичний ефект буде виявлятися протягом тривалого періоду часу.

Короткий опис малюнків

На фіг.1 показаний аналіз калібровочного зразка, взятого у добровольця, на предмет вмісту активного метаболіту (II) за даними рідинної хроматографії - тандемної мас-спектрометрії.

На фіг.2 показаний аналіз зразка плазми, взятого у добровольця після введення, на предмет вмісту активного метаболіту (II) за даними рідинної хроматографії - тандемної мас-спектрометрії.

На фіг.3 показана крива розчинення in vitro композиції 1 з прикладу 1 в фосфатному буфері pH 5,8.

На фіг.4 показана крива розчинення in vitro композиції 2 з прикладу 1 в фосфатному буфері pH 5,8.

На фіг.5 показана крива розчинення in vitro композиції 3 з прикладу 1 в фосфатному буфері pH 5,8.

На фіг.6 показана крива розчинення *in vitro* посилавний композиції з прикладу 3 в фосфатному буфері pH 5,8.

Докладний опис

Даний винахід стосується пероральної системи доставки левозимендану, вдосконаленої в порівнянні з традиційними препаратами негайного вивільнення і тривалої дії. Переваги включають:

- менший максимальний вміст левозимендану в плазмі, що, отже, знижує частоту розвитку небажаних ефектів внаслідок високого вмісту левозимендану, таких як підвищена частота серцевих скорочень;
- знижена частота введення і
- знижене накопичення активного метаболіту (II), що має на увазі кращу переносимість даного лікарського засобу, тобто меншу частоту розвитку небажаних ефектів, що викликаються активним метаболітом, таких як сильний головний біль, більш часте серцебиття і підвищена частота серцевих скорочень.

Вміст метаболіту (II) в плазмі добре корелюється з частотою розвитку небажаних ефектів, таких як сильний головний біль, більш часте серцебиття і підвищена частота серцевих скорочень. При оптимальній терапії левозименданом хворих з серцевою недостатністю постійний вміст метаболіту (II) в плазмі повинний бути меншим за 20нг/мл, переважно, меншим за 10нг/мл.

Переваги досягаються відповідно за даним винаходом за допомогою композиції вивільнення, що контролюється, що містить а) терапевтично ефективну кількість левозимендану і б) компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, призначений для забезпечення вивільнення левозимендану в організмі пацієнта протягом тривалого періоду часу і постійного вмісту метаболіту (II) в плазмі меншого за 20нг/мл, переважно, меншого за 10нг/мл.

Термін "тривалий період часу" означає, принаймні, понад однієї години, переважно, принаймні, понад двох годин після введення. Термін "постійний вміст метаболіту (II)", вжитий вище, стосується середнього значення серед групи пацієнтів.

Переважно, термін "компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу" стосується, як правило, різних технологій, які можуть бути застосовані для контролювання і продовження вивільнення левозимендану за даним винаходом. Такі технології включають матриксні препаративні форми (матриксні таблетки, гранули або пілюлі) або препаративні форми з покриттям (наприклад, таблетки, гранули або пілюлі з покриттям або мікрокапсули). Компоненти, що контролюють вивільнення лікарського засобу, такі як матриксні або покриваючі матеріали, добре відомі в даній області. Вибір даних матеріалів і їх кількостей залежить від бажаного профілю вивільнення і є рутинним для фахівця в даній області. Як компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, можуть бути застосовані будь-які матеріали, що контролюють вивільнення, наприклад, матриксні або покриваючі матеріали або їх поєднання, які застосовні для досягнення профілю вивільнення за даним винаходом. Типові компоненти, що контролюють вивільнення, застосовні за даним винаходом, включають, не обмежуючись, полімери, що створюють гідрофільні гелі, такі як гідроксипропілметилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, альгінова кислота або їх суміш; рослинні жири і олії, включаючи рослинні тверді масла, такі як гідроване соєве масло, загущена касторова олія або масло касторового насіння (що продається під торговим найменуванням Cutina HR), масло бавовняного насіння (що продається під торговими найменуваннями Sterotex і Lubritab) або їх суміш; ефір жирних кислот, такий як тригліцериди насичених жирних кислот або їх суміші, наприклад, гліцерилтристеарати, гліцерилтрипальмітати, гліцерилтриміристиати, гліцерилтрибегенати (що продаються під торговим найменуванням Compritol) і ефір гліцерилпальмітостеаринової кислоти.

Відповідно за даним винаходом можна також застосовувати композиції, призначені для тривалого часу знаходження у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту, наприклад, в шлунку. Це знижує ризик метаболізму левозимендану в товстому кишечнику і подальшого утворення активного метаболіту (II). Перевагою таких композицій, наприклад, плаваючих або плавучих композицій, є те, що їм може бути задане значно більший сумарний час вивільнення, оскільки досягнення нижніх відділів шлунково-кишкового тракту у них займає значно більше часу. Композиції, що характеризуються тривалим часом знаходження в шлунку, описані, наприклад, в Патентах США №№ 4126672, 4814178, 4777033, 5232704 і Європейському патенті 539059.

Таким чином, відповідно до даного винаходу може бути застосована будь-яка композиція левозимендану з тривалим вивільненням, що контролюється, яка забезпечує постійний вміст метаболіту (II) в плазмі менший за 20нг/мл, переважно, менший за 10нг/мл.

Постійний вміст метаболіту (II) в плазмі може бути вимірний для будь-якої композиції шляхом введення композиції левозимендану добровольцеві або групі добровольців один або декілька разів на добу на протязі декількох діб доти, поки не встановиться постійний вміст метаболіту (II) в плазмі. Вміст активного метаболіту (II) в плазмі можливо, крім того, вимірний відповідно за методикою, детально описаної в прикладі 2.

Одним аспектом даного винаходу є композиція з вивільненням левозимендану, що контролюється для перорального введення, яка характеризується своїм профілем розчинення *in vitro*.

Зокрема, даний винахід стосується композиції вивільнення, що контролюється для перорального введення, що містить а) терапевтично ефективну кількість левозимендану і б) компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, призначений для забезпечення вивільнення левозимендану в організмі пацієнта протягом тривалого періоду часу, причому вказана композиція здатна показувати сумарний час розчинення *in vitro*, визначений у відповідності з basket assembly method USP XXII в фосфатному буфері pH 5,8 (при 50 і 100об/хв), по суті, від 1 до 4 годин, принаймні, на 90 відсотків вмісту левозимендану.

Більш переважно, композиція за даним винаходом характеризується сумарним часом розчинення *in vitro*, по суті, від 1 до 3 годин, принаймні, на 90 відсотків вмісту левозимендану.

Компонент або компоненти, що контролює вивільнення лікарського засобу, можуть бути вибрані, як описано вище. Типові компоненти, що контролюють вивільнення, включають, не обмежуючись, полімери, що створюють гідрофільні гелі, такі як гідроксипропілметилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, альгінова кислота або їх суміш; рослинні жири або масла або ефір жирних кислот,

такі як гідроване соєве масло, загущена касторова олія або гліцерилпальмітостеарат.

Спосіб визначення профілю розчинення композицій за даним винаходом *in vitro* описаний в прикладі 3.

Композиція за даним винаходом може знаходитися, наприклад, в формі таблетки, капсули, гранул або порошку.

Особливо переважне здійснення даного винаходу досягається шляхом об'єднання частини швидкого вивільнення, що утримує левозимендан необов'язкове в поєднанні з наповнювачем, з частиною вивільнення, що контролюється, що утримує левозимендан і компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу. Компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, може бути вибраний, як описаний вище, але переважно являє собою полімер, що створює гідрофільний гель. Особливо переважною є композиція, що включає (а) частину швидкого вивільнення в формі порошку, що містить левозимендан в поєднанні, принаймні, з одним наповнювачем, і (б) частина вивільнення в формі гранул, що контролюється, що містять левозимендан і що контролює вивільнення полімеру, що створює гідрофільний гель. Частина швидкого вивільнення в формі порошку і частина вивільнення в формі гранул, що контролюється переважно знаходяться в складі вільно текучої суміші, якою можуть бути заповнені капсули, такі як желатинові капсули і капсули з ГПМЦ.

Особливо переважна композиція за даним винаходом містить 0,05-20%, переважно, 0,1-10%, більш переважно, 0,2-3% левозимендану від маси композиції. Доза лікарського засобу розділена між частинами швидкого вивільнення і вивільнення, що контролюється. Як правило, приблизно 25-75%, переважно, приблизно 30-70%, більш переважно, приблизно 40-60% лікарських засобів за масою знаходиться в частині вивільнення, що контролюється.

Як правило, добова доза левозимендану у людини при пероральному застосуванні становить приблизно 0,1-20мг, звичайно приблизно 0,5-10мг, у вигляді однократної добової дози або розділена на декілька доз на добу. Дозування залежить, наприклад, від віку, маси тіла і стану пацієнта. Композиція переважного здійснення включає приблизно 0,1-5мг, звичайно 0,2-2мг левозимендану, поділеного між частинами швидкого вивільнення і вивільнення, що контролюється. Переважний максимальний постійний вміст левозимендану в плазмі для лікування застійної серцевої недостатності складає в межах від приблизно 1 до приблизно 100нг/мл, більш переважно, від приблизно 5 до приблизно 60нг/мл, і найбільш переважно, від приблизно 10 до приблизно 50нг/мл.

Відповідним наповнювачем для частини швидкого вивільнення є такий наповнювач, як мікрокристалічна целюлоза або лактоза. Мікрокристалічна целюлоза є переважним наповнювачем і доступна в різних видах, таких як Avicel PH101, Avicel PH102 або Avicel PH-200. Кількість наповнювачів в частині швидкого вивільнення становить приблизно 20-70%, переважно приблизно 30-60% від маси композиції. До частини швидкого вивільнення може бути додана відповідна мастяча речовина, така як стеаринова кислота або стеарат магнію. Стеаринова кислота є переважною мастячою речовиною.

Контролюючи вивільнення полімери, що створюють гідрофільні гелі, включають, не обмежуючись, гідроксипропілметилцелюлозу, гідроксипропілцелюлозу, карбоксиметилцелюлозу, альгінову кислоту або їх суміш. Переважною є суміш альгінової кислоти з іншим полімером, створюючим гідрофільний гель, зокрема, суміш альгінової кислоти з гідроксипропілметилцелюлозою. Гідроксипропілметилцелюлоза різних типів комерційно доступна, наприклад, Methocel K100 (м.м. 26000г/моль), Methocel K4M (м.м. 86000г/моль), Methocel K15M (м.м. 120000г/моль) і Methocel K100M. В'язкість даних типів у 2% водному розчині (20°C) становить 100сПз, 4000сПз, 15000сПз і 100000сПз відповідно. Переважною є гідроксипропілметилцелюлоза з в'язкістю 50-2000сПз. Methocel K100 є переважним типом гідроксипропілметилцелюлози.

До частини вивільнення, що контролюється може бути додана відповідна мастяча речовина, така як стеаринова кислота або стеарат магнію. Стеаринова кислота є переважною мастячою речовиною.

Кількість полімеру, що створює гідрофільний гель, в особливо переважному здійсненні даного винаходу становить приблизно 20-80%, переважно, приблизно 30-70% від маси композиції. Переважно, полімер, що створює гідрофільний гель являє собою суміш альгінової кислоти з гідроксипропілметилцелюлозою. Відповідна кількість альгінової кислоти становить приблизно 10-50%, переважно, 20-40% від загальної маси полімеру, що створює гідрофільний гель.

Кількість частини швидкого вивільнення в особливо переважному здійсненні даного винаходу становить приблизно 20-80%, переважно, приблизно 30-70%, -більш переважно, приблизно 40-60% від маси композиції. Кількість мастячої речовини, якщо така присутня, становить приблизно 0,3-10%, більш переважно, приблизно 0,5-5% від маси композиції.

Інше переважне здійснення даного винаходу досягається шляхом змішування компонента, контролюючого вивільнення лікарського засобу, левозимендану і наповнювачів, наприклад, всіх в порошкоподібній формі, і заповнення вказаною сумішшю капсул, таких як желатинова капсула або капсула з ГПМЦ. Компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, може бути вибраний, як описаний вище, але переважно являє собою полімер, що створює гідрофільний гель, який в даному здійсненні застосовують в кількості приблизно 10-70%, переважно, приблизно 15-60%, найбільш переважно, приблизно 20-40% від маси композиції. Полімери, що контролюють вивільнення, що створюють гідрофільні гелі, включають, не обмежуючись, гідроксипропілметилцелюлозу, гідроксипропілцелюлозу, карбоксиметилцелюлозу, альгінову кислоту або їх суміш. Найбільш переважним компонентом, що контролює вивільнення лікарського засобу, є гідроксипропілметилцелюлоза і особливо гідроксипропілметилцелюлоза, що має в'язкість 50-2000сПз, така як Methocel K100, і альгінова кислота або їх суміш. Відповідна кількість наповнювача (наприклад, мікрокристалічної целюлози або лактози), що застосовується в даному здійсненні, становить приблизно 30-90%, переважно, приблизно 40-80%, найбільш переважно, приблизно 50-70% від маси композиції. Левозимендан застосовують в кількості, описаній застосовно до попереднього переважного здійснення.

Ще одне переважне здійснення даного винаходу знаходиться в формі матричної таблетки, яку отримують шляхом змішування компонента, контролюючого вивільнення лікарського засобу, левозимендану і наповнювачів, таких як мікрокристалічна целюлоза, лактоза і/або стеаринова кислота, і пресування суміші в

матриксні таблетки за допомогою відповідної таблетувальної машини. Знову ж, компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, може бути вибраний, як описано вище. Переважно компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, представляє полімер, що створює гідрофільний гель, або рослину олію або масло або ефір жирної кислоти, як описано вище. У даному здійсненні компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, застосовують в кількості приблизно 0,5-60% від маси композиції, а відповідна кількість наповнювача (наприклад, мікрокристалічної целюлози), що застосовується становить приблизно 30-99% від маси композиції. Якщо компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, являє собою полімер, що створює гідрофільний гель, наприклад, гідроксипропілметилцелюлозу, і переважно, гідроксипропілметилцелюлозу, що має в'язкість 50-2000сПз, таку як Methocel K100, і альгінову кислоту або їх суміш, то компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, застосовують в кількості приблизно 5-60%, переважно, приблизно 10-50%, найбільш переважно, приблизно 15-40% від маси композиції, а відповідна кількість наповнювача (наприклад, мікрокристалічної целюлози) становить приблизно 30-95%, переважно, приблизно 50-90%, найбільш переважно, приблизно 60-85% від маси композиції. Якщо компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, являє собою рослинну олію або масло або ефір жирної кислоти, такий як гідрована соєва олія, загущена касторова олія або гліцерилпальмітостеарат, то компонент, що контролює вивільнення лікарського засобу, застосовують в кількості приблизно 0,5-30%, переважно, приблизно 2-20%, найбільш переважно, приблизно 3-15% від маси композиції, а відповідна кількість наповнювача (наприклад, мікрокристалічної целюлози) становить приблизно 70-99%, переважно, приблизно 80-98%, найбільш переважно, приблизно 85-97% від маси композиції. Левозимендан застосовують в кількості, описаній застосовно до попереднього переважного здійснення.

Наступні приклади призначені для подальшого роз'яснення даного винаходу без обмеження його об'єму.

Приклад 1. Приклади композицій

Композиція 1		
Гранульована частина:	Левозимендан	1,0мг
	Альгінова кислота	18,0мг
	Methocel K100LV	37,0мг
	Стеаринова кислота	0,6мг
Порошкоподібна частина:	Левозимендан	1,0мг
	Avicel PHI 01	84,0мг
	Стеаринова кислота	1,5мг
Композиція 2		
Гранульована частина:	Левозимендан	1,0мг
	Альгінова кислота	23,0мг
	MethocelK 100LV	46,0мг
	Стеаринова кислота	-
Порошкоподібна частина:	Левозимендан	1,0мг
	Avicel PHI01	69,5мг
	Стеаринова кислота	1,5мг
Композиція 3		
Гранульована частина:	Левозимендан	1,0мг
	Альгінова кислота	28,0мг
	Methocel K100LV	56,0мг
	Стеаринова кислота	0,9мг
Порошкоподібна частина:	Левозимендан	1,0мг
	Avicel PHI01	56,0мг
	Стеаринова кислота	1,5мг
Композиція 4		
Гранульована частина:	Левозимендан	1,0мг
	Альгінова кислота	33,0мг
	Methocel K100LV	66,0мг
	Стеаринова кислота	0,6мг
Порошкоподібна частина:	Левозимендан	1,0мг
	AvicelPHI01	43,0мг
	Стеаринова кислота	1,5мг

У приведених вище прикладах матеріал для гранульованої частини просівали і змішували до гомогенного стану у відповідному змішувачі, такому як змішувач Turbula або контейнерний змішувач Zanchetta. Порошкоподібну суміш просівали через 0,6мм сито. Суміш піддавали сухому гранулюванню шляхом пресування (за допомогою таблетувальної машини). За даною методикою масу пресували із застосуванням Верех Pharmapactor L200/50P з силою стиснення приблизно 45кН. Пресовану масу просівали і гранули

розміром 0,7-1,7мм збирали.

Матеріал для порошкоподібної частини за винятком стеаринової кислоти просівали і змішували до гомогенного стану у відповідному змішувачі, такому як змішувач Turbula або контейнерний змішувач Zanchetta. Гранульовану частину і порошкоподібну частину і стеаринову кислоту змішували до гомогенного стану у відповідному змішувачі, такому як змішувач Turbula або контейнерний змішувач Zanchetta. Даною масою заповнювали тверді желатинові капсули № 3. Замість твердих желатинових капсул також можуть бути застосовані капсули з ГПМЦ № 3.

Приклад 2. Визначення вмісту активного метаболіту (II) в плазмі людини з допомогою рідинної хроматографії - tandemної мас-спектрометрії

Приготування калібрувальних зразків

Активний метаболіт (II) в 20мкл фосфатного буфера, pH 7,2, додають до 0,5мл плазми, що не містить сполуки, що аналізується. Кількість доданої сполуки, що аналізується становить 0,100, 0,250, 0,500, 1,00, 2,50, 3,75, 5,00, 7,50 і 12,5нг. Після струшування протягом 20 секунд і витримування протягом 10 хвилин 2500пг внутрішнього стандарту (R)-N-[4-(1,4,5,6-тетрагідро-4-етил-6-оксо-3-піридазиніл)феніл]ацетаміду додавали в 20мкл фосфатного буфера, pH 7,2. Суміш струшували протягом 1 хвилини і витримували протягом 15 хвилин. Калібрувальні зразки підлужували 50мкл 0,1М гідроксиду натрію і струшували протягом 20 секунд. Калібрувальні зразки екстрагували додаванням 5мл етилацетату:гексану (8:2) шляхом струшування протягом 3 хвилин. Після центрифугування протягом 7 хвилин органічний шар відокремлюють і концентрують при 40°C, застосовуючи випарник TurboVar. Коли калібрувальні зразки стають сухими, додають 200мкл етилацетату:гексану (8:2), струшують протягом 1 хвилини і концентрують при 40°C, застосовуючи випарник TurboVar. Після цього додають 200мкл метанолу - 2мМ ацетату амонію (1:1), калібрувальні зразки струшують протягом 1 хвилини і витримують протягом 5 хвилин. Після центрифугування протягом 7 хвилин супернатант переносять в невикористану конічну посудину автоматичного семплера для аналізу з допомогою рідинної хроматографії - tandemної мас-спектрометрії.

Приготування зразків

Зразки обробляють, як описано вище, але перша порція буфера не містить сполуки, що аналізується.

Рідинна хроматографія - tandemна мас-спектрометрія

Аналізи проводять з допомогою tandemного квадрупольного мас-спектрометра PE Sciex API 300, обладнаного розпилювальним пристроєм введення, що нагрівається. Для проведення ВЕРХ використовують систему Hewlett-Packard HP 1090L. Колонка, що застосовується представляє колонку для звернено-фазової хроматографії LiChrosorb RP-18 (250мм x внутрішній діаметр 4мм, E. Merck). Рухома фаза складається з метанолу - 2мМ ацетату амонію, pH 5, (60:40 за об'ємом). Швидкість елюції становить 1 мл/хв. Аліквоту 100мкл екстракту вводять в колонку для рідинної хроматографії.

Елюент з колонки витікає в мас-спектрометр без розділення потоку. Напряга на розподільній голці встановлюють рівну 4кВ. Застосовують тиск газу (азоту) в розпилювачі 5бар. Нагрівник пристрою введення встановлюють на 500°C. Напряга на дисковій діафрагмі становить 25В. Позитивні іони відбирають в квадрупольний мас-аналізатор.

Вимірювання проводять з використанням вибраної методики моніторингу реакції. Перший квадрупольний фільтр мас-спектрометра, Q1, встановлюють на пропущення протонованих молекул при m/z 246 для активного метаболіту (II) і m/z 260 для внутрішнього стандарту фрагментації, що індукуються зіткненням в Q2. Відповідні отримані іони при m/z 204 і m/z 218 потім пропускаються в Q3 для реєстрації. Використовують час перебування 200мс і час затримки 100мс. Вибрані хроматограми моніторингу реакції записують з використанням PE Sciex API 300 Data System.

Кількісне визначення і розрахунки

Відношення площі піків сполуки, що аналізується і його внутрішнього стандарту зображаються на графіку проти концентрацій. Визначення рівнянь калібрувальної кривої і концентрацій невідомих зразків проводять за допомогою PE Sciex API 300 Data System і програми PE Sciex McQuan 1.4. Порогом кількісного визначення є 0,200нг/мл. Будують калібрувальну криву для активного метаболіту (II).

Специфічність

Отримані іони активного метаболіту (II) і його внутрішнього стандарту реєструються відповідно до вибраної методики моніторингу реакції. Методика є специфічною по відношенню до фону, що створюється плазмою. В "пустих" екстрактах плазми піків, що перекриваються не спостерігається. На фігурах 1 і 2 показані калібрувальний зразок плазми і зразок-плазми після введення, взятий у добровольця.

Приклад 3. Експерименти In vitro і in vivo з використанням композицій за даним винаходом

Композиції 1, 2 і 3 з прикладу 1 піддавали тесту розчинення. Швидкість розчинення композицій досліджували відповідно за методикою Фармакопеї США XXII (basket assembly method) в фосфатному буфері, pH 5,8, при 50об./хв. Результати за композиціями 1, 2 і 3 приведені відповідно на фігурах 3, 4 і 5.

Композиції 1, 2 і 3 з прикладу 1 потім вводили здоровим добровольцям у вигляді разової пероральної дози 2мг левозимендану. Кожна група складалася з 9 пацієнтів. Вміст метаболіту (II) в плазмі визначають через 12 годин після введення. Результати приведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Концентрація метаболіту (II) (пг/мл) в плазмі у здорових добровольців через 12г. після разової пероральної дози левозимендану (n = 9). Клінічне випробування 3001047

Суб'єкт	Композиція 1	Композиція 2	Композиція 3
1	<	<	<
2	<	205	<
3	298	295	347

4	214	240	262
5	<	<	<
6	249	572	1300
7	<	<	<
8	<	<	<
9	<	392	<
Середнє	85	189	212
CO.	129	208	429

С.О. = стандартне відхилення

< = менше за поріг визначення (200 пг/мл)

Приклад 4. Експерименти in vitro і in vivo з використанням посиляльних композицій

Посиляльну-композицію, що складається з

Левозимендану 2,0мг

Methocel K4M 35,0мг

Avicel PH101 101,6мг

Стеаринової кислоти 1,4мг,

піддавали тесту розчинення. Композицію готували шляхом просіювання і змішування порошкоподібного матеріалу до гомогенного стану і заповнення даною масою твердих желатинових капсул № 3.

Швидкість розчинення композицій досліджували відповідно за методикою Фармакопеї США XXII (basket assembly method) в фосфатному буфері, рН 5,8, при 100об./хв. Результата приведені на фігурі 6.

Посиляльну композицію потім вводили 8 здоровим добровольцям у вигляді разової пероральної дози 2мг левозимендану. Вміст метаболіту (II) в плазмі визначали через 12 годин після введення. Результати приведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Концентрація метаболіту (II) (пг/мл) в плазмі у здорових добровольців через 12г. після разової пероральної дози левозимендану (n = 8). Клінічне випробування 3001047

Суб'єкт	Посиляльна композиція
1	<
2	283
3	1330
4	1260
5	253
6	268
7	492
8	833
Середнє	590
CO.	496

С.О. = стандартне відхилення

< = менший за поріг визначення (200пг/мл)

Таким чином, композиції за даним винаходом, що характеризуються сумарним часом розчинення in vitro, визначеним відповідно за методикою basket assembly method Фармакопеї США XXII в фосфатному буфері, рН 5,8, що складає, по суті, 1-4 години, принаймні, на 90 відсотків від вмісту левозимендану, сприяють появі значно меншого вмісту, метаболіту (II) in vivo, чим посиляльна композиція, яка характеризується великим часом розчинення.

Приклад 5. Вміст левозимендану і активного метаболіту (II) в плазмі після 7 діб введення левозимендану

В ході довгострокового клінічного дослідження здоровим добровольцям три рази на добу протягом 7 діб перорально вводили 1мг левозимендану. У ході обробки стежили за вмістом левозимендану і метаболіту (II) в плазмі. Композиція, що застосовується була аналогічною - композиції 3 з прикладу 1 за винятком того, що загальна кількість левозимендану становила 1 мг, а мікрокристалічної целюлози (Avicel PH-200) - 51,0мг. Середній вміст левозимендану в плазмі через 1 і 4 години після введення останньої дози (7 діб) і метаболіту (II) через 8 годин після введення останньої дози (7 діб) приведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Середній вміст левозимендану і активного метаболіту (II) в плазмі після 7 діб введення левозимендану

	Левозимендан (7 діб)		Метаболіт (II) (7 діб)
	1г	4г	8г
Вміст в плазмі	15,4	8,9	3,44

CO. (нг/мл)	8,9	4,9	1,84
N	14	14	13

CO. = стандартне відхилення

N = число пацієнтів

Результати показують, що композиція за даним винаходом забезпечує постійний і терапевтично ефективний вміст левозимендану в плазмі протягом тривалого періоду часу в той час, як постійний вміст в плазмі метаболіту (II) залишається на допустимому рівні.

Приклад 6. Подальші приклади композицій

Композиція 6 (капсула)

Левозимендан	1,0мг
Methocel K100 LV	35,0мг
Avicel PH-200	80,5мг
Стеаринова кислота	6,4мг

Левозимендан, Methocel K100 LV і мікрокристалічну целюлозу (Avicel) просівали і змішували у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Стеаринову кислоту просівали і змішували з даною масою у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Даною масою потім заповнювали білі желатинові капсули № 3 за допомогою машини для заповнення капсул Haffg Hofliger, MG2 або аналогу.

Дані за розчиненням вказаної композиції (Фармакопея США XXII, фосфатний буфер, pH 5,8, 100об./хв) приведені в таблиці 4:

Таблиця 4

Крива розчинення in vitro для композиції 6 в фосфатному буфері, pH 5,8, 100об./хв

Min	% розчинення
5	12,1
15	43,7
30	65,0
45	77,4
60	88,3
120	95,7
180	97,4
240	97,8
300	98,1
360	98,1

Композиція 7 (матриксна таблетка)

Левозимендан	1,0мг
Methocel K100 LV	30,0мг
Кроскармелоза натрію	0,27мг
Avicel PH-200	100,0мг
Стеаринова кислота	4,0мг

Левозимендан, Methocel K100 LV, кроскармелозу натрію і мікрокристалічну целюлозу (Avicel) змішували у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Порошкоподібну суміш потім просівали і змішували у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Стеаринову кислоту потім просівали і змішували з порошкоподібною сумішшю у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Дану масу потім спресовували в таблетки за допомогою відповідної таблетирувальної машини (діаметр штампу 7мм і радіус ввігнутості 10,5мм, твердість 60Н).

Дані за розчиненням вказаної композиції (Фармакопея США XXII, фосфатний буфер, pH 5,8, 100 об./хв) наступні:

Таблиця 5

Крива розчинення in vitro для композиції 7 в фосфатному буфері, pH 5,8, 100об./хв

Min	% розчинення
10	33,7
20	47,8
30	60,9
40	72,6
50	78,5
60	82,5
90	88,5
120	90,0
180	92,2

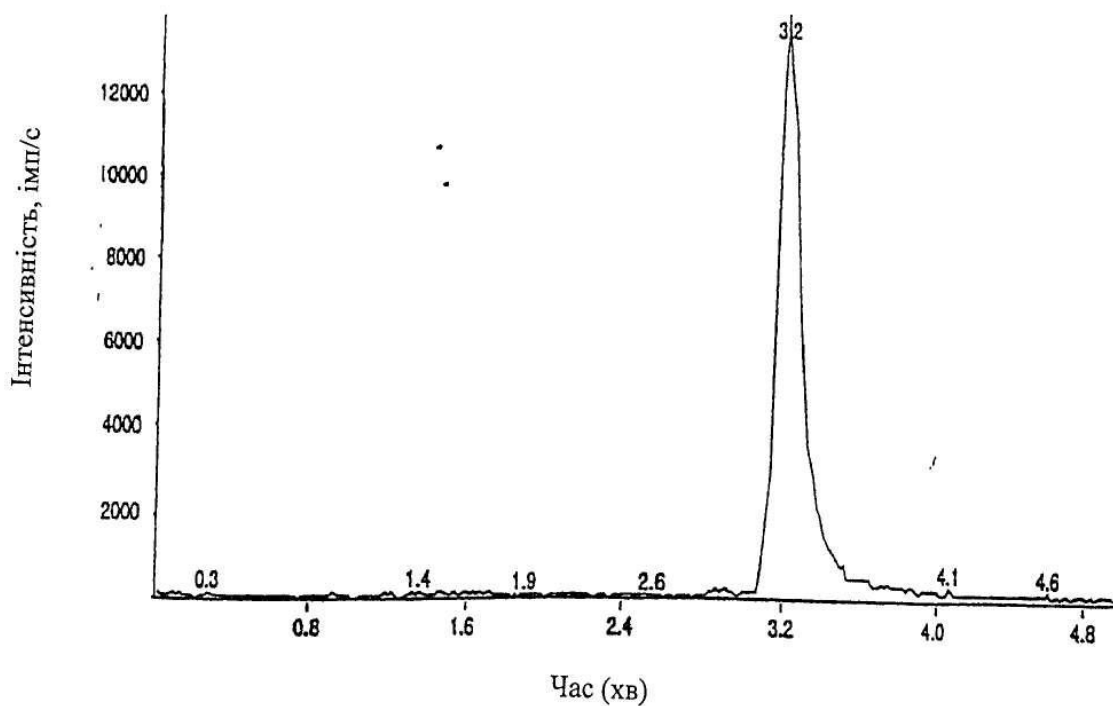
240	94,8
300	96,9

Композиція 8 (матрична таблетка)

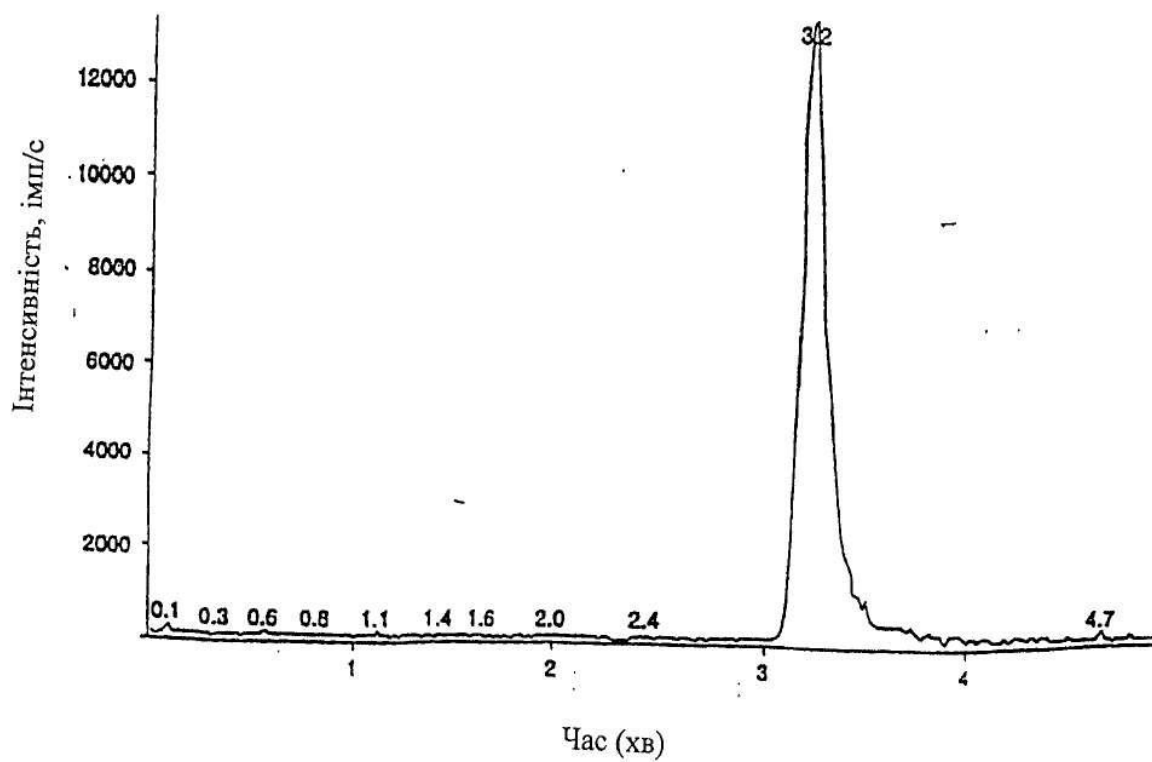
Левозимендан	1,0мг
Кроскармелоза натрію	0,11мг
Akofme NF	10,0мг
Avicel PH-200	100,0мг

Левозимендан, кроскармелозу натрію і мікрокристалічну целюлозу (Avicel) змішували у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Порошкоподібну суміш потім просівали і змішували у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Akofme NF (гідрована рослинна олія) потім просівали і змішували з порошкоподібною сумішшю у відповідному змішувачі (Turbula або аналогу). Дану масу потім спресовували в таблетки за допомогою відповідної таблетирувальної машини (діаметр штамплу 7мм і радіус ввігнутості 10,5мм, твердість 60Н).

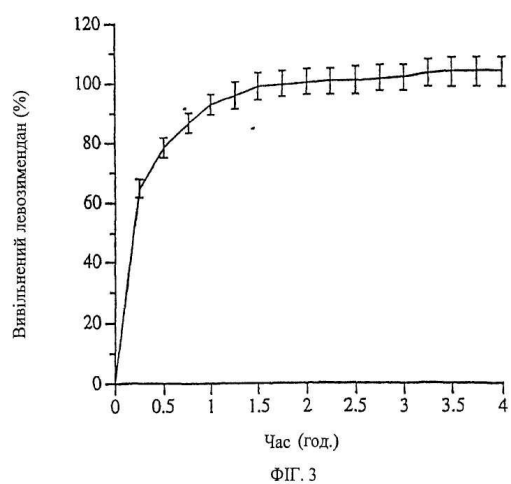
Різноманітні модифікації і варіації розкритих здійсненні можуть бути проведені без виходу за рамки об'єму даного винаходу, визначеного в наступній формулі винаходу.



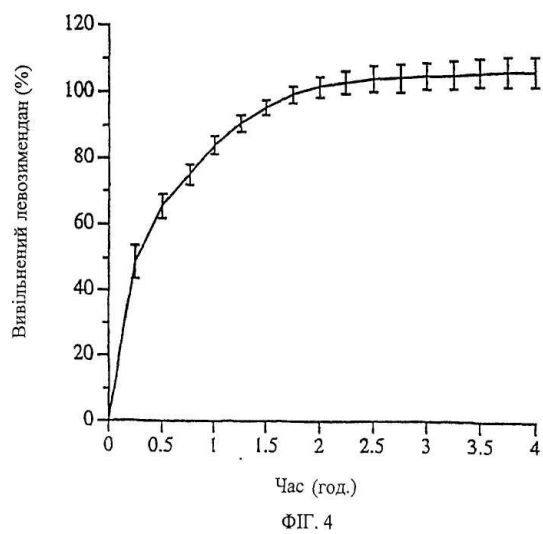
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4

