



УКРАЇНА

(19) UA (11) 69303 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 9/127

A61K 9/133

A61K 36/00

A61K 47/44

A61K 47/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОГО АНТИБАКТЕРІАЛЬНОГО ЗАСОБУ ХЛОРОФІЛІПТУ

1

(21) 20031212367

(22) 25.12.2003

(24) 15.02.2006

(46) 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.

(72) Теміров Юрій Павлович, Швець Віталій Іванович, RU, Краснополський Юрій Михайлович, Сеннікова Ірина Георгіївна

(73) ЗАКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ХАРКІВСЬКЕ ПІДПРИЄМСТВО ПО ВИРОБНИЦТВУ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ "БІОЛІК"

(56) UA A 46528 15.05.2002

Применение хлорофиллипта для лечения и профилактики гнойно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии. Методические рекомендации / Харьковский НИИ микробиологии, вакцин и сывороток им. Мечникова - Харьков, 1988. - 29 с.

UA A 28659 16.10.2000

2

UA C2 39462 15.06.2001

RU C1 2117474 20.08.1998

EP A2 0198765 22.10.1986

US A 5077056 31.12.1991

(57) Спосіб одержання ліпосомального антибактеріального засобу шляхом створення розчину суміші, яка містить фосфатидилхолін, висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії з додаванням лактози, поетапної фільтрації, стерилізуючої фільтрації, розливу і ліофільного висушування, який відрізняється тим, що спиртовий розчин фосфатидилхоліну змішують зі спиртовим розчином хлорофіліпту із співвідношенням інгредієнтів (мас. ч.) (10-30):1, висушування суміші у вакуумі виконують при температурі 35-45°C, а співвідношення фосфатидилхолін:водне середовище емульгування становить (мас. ч.) 1:(40-120).

Винахід належить до фармації, а саме до способу отримання ліпосомального засобу, який має антибактеріальні властивості, і може використовуватися для лікування та профілактики гнійно-запальних інфекцій стафілококової етіології.

Відомий антибактеріальний препарат природного походження з листя евкаліпту - хлорофіліпт, який виявляє високу антибактеріальну активність відносно клінічне антибіотикостійких штамів мікроорганізмів. Причому на відміну від антибіотиків, пригніблюючи патогенні мікроорганізми, він не чинить пригніблюючої дії на нормальну мікрофлору людини (Применение хлорофиллипта для лечения и профилактики гнойно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии. Методические рекомендации / Харьковский научно-исследовательский институт микробиологии, вакцин и сывороток им. Мечникова. - Х.: 1988. - 29с.). Складність застосування препарату полягає у то-

му, що хлорофіліпт є водонерозчинним продуктом. Для внутрішньовенного застосування хлорофіліпт випускають у вигляді 0,25% спиртового розчину в ампулах по 2мл. Використання етанольного розчину хлорофіліпту можливо лише при розведенні препарату 0,9% розчином натрію хлориду ізотонічного (1:20) до певних концентрацій спирту - 5%. Вміст спирту більш високої концентрації неприпустимий при внутрішньовенному введенні, а більш низька концентрація спирту призводить до появи пластівців у препараті, що також робить його використання неможливим. Усе вищезгадане не дозволяє вводити значні терапевтичні дози, а введення препарату багаторазово (оптимально 4 рази на добу, тому що терапевтична концентрація зберігається у середньому 6 год), утруднює лікувальний процес і тяжко переноситься хворими. Застосування хлорофіліпту внутрішньокраплинно за допомогою системи не рекомендується через мо-

(13) C2

(11) 69303

(19) UA

жливистість його адсорбції на стінках трубки.

Критерієм ефективності у створенні оптимальних засобів терапії бактеріальних інфекцій адекватні способи отримання ліпосомальних продуктів, які містять фосфоліпіди - основні компоненти ліпідного матрикса клітинних мембран.

Відомий спосіб отримання ліпосомальної композиції на основі природного фосфатидилхоліну (яєчного лецитину) (Патент України №46528 А, МПК⁶ А 61 К 9/127, А 61 К 33/06, 2002), обраний прототипом заявляемого об'єкту, як найбільш близький його аналог за сумою ознак, а саме: суттю і послідовністю здійснення основних операцій і заходів та ліпосомальною організацією цільового продукту. Спосіб за прототипом передбачає створення розчину суміші, яка містить фосфатидилхолін, висушування суміші у вакуумі при температурі 30-40°C, її емульгування у водному середовищі при співвідношенні фосфатидилхолін: водне середовище емульгування (мас. ч.) 1 : (60-80), диспергування емульсії з додаванням лактози у вигляді водного розчину, поетапну фільтрацію, послідовно зменшуючи розмір пор на фільтрах, стерилізуючу фільтрацію, розлив та ліофільне висушування. Однак використований склад ліпосомальної композиції не дозволяє отримати препарат з антибактеріальними властивостями.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу створити спосіб отримання ліпосомального антибактеріального засобу, який дозволяє одержати водорозчинну форму цільового продукту

- хлорофіліпту з пролонгованою дією на організм.

Реалізація цієї задачі досягається заявляємим способом отримання ліпосомального антибактеріального засобу на основі ліпосомальної композиції певних співвідношень двох речовин, а саме: природного фосфоліпіду - фосфатидилхоліну та природного антибактеріального засобу з листя евкаліпту - хлорофіліпту.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі отримання ліпосомального засобу, що включає створення розчину суміші, яка містить фосфатидилхолін, висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії з додаванням лактози, поетапну фільтрацію, стерилізуючу фільтрацію, розлив та ліофільне висушування, згідно з винаходом, спиртовий розчин фосфатидилхоліну змішують зі спиртовим розчином хлорофіліпту із співвідношенням інгредієнтів (мас. ч.) (10-30) : 1, висушування суміші у вакуумі виконують при температурі 35-45°C, а співвідношення фосфатидилхолін : водне середовище емульгування становить (мас. ч.) 1 : (40-120).

Залежність характеристик якості ліпосомального засобу від співвідношення фосфатидилхолін: хлорофіліпт, температури висушування суміші у вакуумі та співвідношення фосфатидилхолін: водне середовище емульгування та технічний результат, що отриманий за їх допомогою, наведені в табл.1 - 3.

Таблиця 1

Залежність характеристик якості ліпосомального засобу від співвідношення фосфатидилхолін : хлорофіліпт

Показники	Співвідношення фосфатидилхолін : хлорофіліпт, мас. ч.				
	5:1	10:1	20:1	30:1	35:1
Включення хлорофіліпту до ліпосоми, %	70	92	100	100	100
Антибактеріальна активність відносно St aureus	неможливо виконувати	активний	активний	активний	низька активність
Розмір ліпосом, нм	240	160	150	150	130
Можливість стерилізуючої фільтрації	неможливо	можливо	можливо	можливо	можливо

Як видно з даних, наведених у табл.1, оптимальним є співвідношення фосфатидилхолін : хлорофіліпт (мас. ч.) (10-30) : 1. Використання співвідношень менш зазначених призводить до зниження включення хлорофіліпту до ліпосоми, що призводить до появи вільного хлорофіліпту,

заважаючого провадженню стерилізуючої фільтрації, а також збільшує розмір ліпосом у продукті, що небажано при внутрішньовенному введенні засобу. Збільшення співвідношення призводить до зниження антибактеріальної активності засобу.

Таблиця 2

Залежність характеристик якості ліпосомального засобу від температури висушування суміші у вакуумі

Показники	Температура висушування суміші у вакуумі, °C				
	30	35	40	45	50
Включення хлорофіліпту до ліпосоми, %	89	100	100	100	100
Індекс окислювання	0,18	0,18	0,2	0,23	0,31

Як видно з даних, наведених у табл. 2, оптимальною температурою висушування суміші у вакуумі є температура 35-45°C, яка забезпечує повне включення хлорофіліпту до фосфатидилхолінової ліпосоми. Зменшення тем-

ператури призводить до нерівномірного розчину хлорофіліпту у фосфатидилхоліні, що призводить до неповного включення його до ліпосоми. Збільшення температури збільшує індекс окислювання.

Таблиця 3

Залежність характеристик якості ліпосомального засобу від співвідношення фосфатидилхолін : водне середовище емульгування

Показники	Співвідношення фосфатидилхолін : водне середовище емульгування, мас. ч.				
	1:30	1:40	1:80	1:120	1:140
Включення хлорофіліпту до ліпосоми, %	100	100	100	100	92
Розмір ліпосом, нм	300	240	220	200	200

Як видно з наведених у табл.3 даних, оптимальним є співвідношення фосфатидилхолін : водне середовище емульгування (мас. ч.) 1 : (40-120). Зменшення співвідношення призводить до збільшення розміру ліпосом, що заважає провадженню стерилізуючої фільтрації. Збільшення співвідношення призводить до зниження включення хлорофіліпту до ліпосоми, що також заважає провадженню стерилізуючої фільтрації.

Можливість здійснення винаходу ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1

Точну наважку 250 г фосфатидилхоліну („лецитинове масло" - „лецитин-стандарт", випарений до постійної ваги) розчиняють влі спирту етилового. До отриманого розчину додають 200 мл спирту етилового, що містить 25 г хлорофіліпту (субстанція хлорофіліпту у вигляді масла). Суміш розчинів ретельно перемішують і переносять у круглодонну скляну колбу, яку вміщують на ротаційний випарувач, і видаляють спирт етиловий у вакуумі при температурі 35-45°C. По закінченні процесу випаровування у колбу протягом 5°хв пропускають інертний газ. Отриману ліпідну плівку із стінок колби кількісно знімають порціями по 1 л води для ін'єкцій. Кожну порцію переносять в одну скляну ємність. Після повного зняття плівки у скляну ємність додають воду для ін'єкцій до об'єму рідини 20 л і перемішують протягом 1 год. Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску „α – Laval", додають 7 л води для ін'єкцій і піддають диспергуванню при тиску 60 МПа і температурі 40-45°C з контролем оптичної густини рідини, що гомогенізується. При досягненні показника оптичної густини - не більше 0,2 (довжина хвилі 540 нм; товщина шару поглинання = 0,5 см) до отриманої емульсії додають стерильний розчин 250 г лактози (молочний цукор фармакопейний) у 3 л води для ін'єкцій. Продовжують диспергування в реакторі гомогенізатора високого тиску до досягнення показника оптичної густини емульсії не більше 0,15 (довжина хвилі 540 нм; товщина шару поглинання = 0,5 см). Отриману емульсію послідовно фільтрують на установці „Millipore" через мембрани 0,65 мкм, 0,45 мкм, потім - 0,22 мкм, далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах в скляні флакони

на 50 мл. Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню до -70°C та проводять ліофільне (сублімаційне) висушування в установці ТГ-50. Після висушування флакони продувають інертним газом, закривають і герметизують флакони із ліпосомальним продуктом в асептичних умовах. Цільовий продукт є аморфна маса зеленого кольору з характерним запахом.

Приклад 2

Точну наважку 500 г фосфатидилхоліну („лецитинове масло" - „лецитин-стандарт", випарений до постійної ваги) розчиняють влі спирту етилового. До отриманого розчину додають 200 мл спирту етилового, що містить 25 г хлорофіліпту (субстанція хлорофіліпту у вигляді масла). Суміш розчинів ретельно перемішують і переносять у круглодонну скляну колбу, яку вміщують на ротаційний випарувач, і видаляють спирт етиловий у вакуумі при температурі 35-45°C. По закінченні процесу випаровування у колбу протягом 5 хв пропускають інертний газ. Отриману ліпідну плівку із стінок колби кількісно знімають порціями по 1 л води для ін'єкцій. Кожну порцію переносять в одну скляну ємність. Після повного зняття плівки у скляну ємність додають воду для ін'єкцій до об'єму рідини 20 л і перемішують протягом 1 год. Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску „α – Laval", додають 7 л води для ін'єкцій і піддають диспергуванню при тиску 60 МПа і температурі 40-45°C з контролем оптичної густини рідини, що гомогенізується. При досягненні показника оптичної густини не більше 0,2 (довжина хвилі 540 нм; товщина шару поглинання = 0,5 см) до отриманої емульсії додають стерильний розчин 500 г лактози (молочний цукор фармакопейний) у 3 л води для ін'єкцій. Продовжують диспергування в реакторі гомогенізатора високого тиску до досягнення показника оптичної густини емульсії не більше 0,15 (довжина хвилі 540 нм; товщина шару поглинання = 0,5 см). Отриману емульсію послідовно фільтрують на установці „Millipore" через мембрани 0,65 мкм, 0,45 мкм, потім - 0,22 мкм, далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах в скляні флакони на 50 мл. Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню до -70°C та проводять ліофільне (сублімаційне) висушування в установці

ТГ-50. Після висушування флакони продувають інертним газом, закривають і герметизують флакони із ліпосомальним продуктом в асептичних умовах. Цільовий продукт є аморфна маса зеленого кольору з характерним запахом.

Приклад 3

Точну наважку 750 г фосфатидилхоліну („лецитинове масло” - „лецитин-стандарт”, випарений до постійної ваги) розчиняють в 1 л спирту етилового. До отриманого розчину додають 200 мл спирту етилового, що містить 25 г хлорофіліпту (субстанція хлорофіліпту у вигляді масла). Суміш розчинів ретельно перемішують і переносять у круглодонну скляну колбу, яку вміщують на ротаційний випарувач, і видаляють спирт етиловий у вакуумі при температурі 35-45°C. По закінченні процесу випаровування у колбу протягом 5 хв пропускають інертний газ. Отриману ліпідну плівку із стінок колби кількісно знімають порціями по 1 л води для ін'єкцій. Кожну порцію переносять в одну скляну ємність. Після повного зняття плівки у скляну ємність додають воду для ін'єкцій до об'єму рідини 20 л і перемішують протягом 1 год. Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску „α-Laval”, додають 7 л води для ін'єкцій і піддають диспергуванню при тиску 60 МПа і температурі 40-45°C з контролем оптичної густини рідини, що гомогенізується. При досягненні показника оптичної густини не більше 0,2 (довжина хвилі

540 нм; товщина шару поглинання = 0,5 см) до отриманої емульсії додають стерильний розчин 750 г лактози (молочний цукор фармакопейний) у 3 л води для ін'єкцій. Продовжують диспергування в реакторі гомогенізатора високого тиску до досягнення показника оптичної густини емульсії не більше 0,15 (довжина хвилі 540 нм; товщина шару поглинання = 0,5 см). Отриману емульсію послідовно фільтрують на установці „Millipore” через мембрани 0,65 мкм, 0,45 мкм, потім - 0,22 мкм, далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах в скляні флакони на 50 мл. Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню до 70°C та проводять ліофільне (сублімаційне) висушування в установці ТГ-50. Після висушування флакони продувають інертним газом, закривають і герметизують флакони із ліпосомальним продуктом в асептичних умовах. Цільовий продукт є аморфна маса зеленого кольору з характерним запахом.

Для провадження досліджень ліпосомального цільового продукту використовували емульсію, одержану шляхом додавання у флакони з засобом стерильного 0,9% розчину натрію хлориду ізотонічного.

Ефективність способу, що заявляється, за показниками якості цільового ліпосомального продукту у порівнянні із стандартним продуктом, наведена у табл. 4.

Таблиця 4

Показники	Ліпосомальний продукт	Стандартний продукт
Форма випуску	Аморфна маса зеленого кольору	0,25% спиртовий розчин зеленого кольору
Розчинник готового продукту	Розчин 0,9% натрію хлориду ізотонічного, або вода для ін'єкцій - 100%	95,6% розчин спирту етилового
Вміст хлорофіліпту в 1 мл засобу при внутрішньовенному введенні, мг	1,66	0,125
Уведення засобу внутрішньо краплинно	можливо	неможливо
Час зберігання терапевтичної концентрації засобу при внутрішньовенному введенні у кроликів, год	12	6
Антибактеріальна активність відносно St aureus	активен	активен

Як видно з наведених у табл.4 даних, цільовий ліпосомальний продукт - хлорофіліпт, отриманий способом, що заявляється, має суттєві переваги перед стандартним продуктом - хлорофіліптом:

1. Є водорозчинним продуктом (100%), що дозволяє позбавитись від спирту при внутрішньовенному введенні засобу.

2. Дозволяє уводити разово значні терапевтичні дози через те що вміст хлорофіліпту в 1 мл засобу при внутрішньовенному введенні в 8 разів більше, ніж у стандартного продукту, і його терапевтична концентрація зберігається в 2 рази довше (продовжена дія на організм).

3. Дозволяє уводити засіб внутрішньокраплин-

но. При цьому отриманий ліпосомальний засіб - хлорофіліпт також виявляє антибактеріальну активність відносно St aureus.

З огляду на викладене вище і з урахуванням розкритого причинно-наслідкового зв'язку між сукупністю ознак винаходу, що заявляється, та технічним результатом, що отриманий за їх допомогою, можна стверджувати, що задача, поставлена в основу створеного способу отримання ліпосомального антибактеріального засобу, цілком виконана, бо такий спосіб дозволяє одержати водорозчинну форму цільового продукту - хлорофіліпту з продлонгованою дією на організм.