



УКРАЇНА

(19) UA (11) 90013 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/28

A61K 47/36

A61K 9/52

A61P 3/10 (2006.01)

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

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ІНСУЛІН, І СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ

1

(21) а200803496

(22) 19.03.2008

(24) 25.03.2010

(46) 25.03.2010, Бюл.№ 6, 2010 р.

(72) НОГА ДАВИД АНАТОЛІЙОВИЧ, МАТВЄЄВ
ПАВЛО ГЕОРГІЙОВИЧ, МАРКІН СЕРГЕЙ СЕРГЄ-
ЄВИЧ, RU, БЕРЕНШТЕЙН ДМІТРІЙ БОРИСОВИЧ,
RU, СЕМЬОНОВ МИХАІЛ ПЕТРОВИЧ, RU, ТАРА-
СОВ ОЛЕКСАНДР АНДРІЙОВИЧ, ТАРАСОВА
ОЛЬГА МАРАТОВНА, РЕДЬКІН ІГОР В'ЯЧЕСЛА-
ВОВИЧ(73) НОГА ДАВИД АНАТОЛІЙОВИЧ, МАТВЄЄВ
ПАВЛО ГЕОРГІЙОВИЧ, МАРКІН СЕРГЕЙ СЕРГЄ-
ЄВИЧ, RU, БЕРЕНШТЕЙН ДМІТРІЙ БОРИСОВИЧ,
RU, СЕМЬОНОВ МИХАІЛ ПЕТРОВИЧ, RU, ТАРА-
СОВ ОЛЕКСАНДР АНДРІЙОВИЧ, ТАРАСОВА
ОЛЬГА МАРАТОВНА, РЕДЬКІН ІГОР В'ЯЧЕСЛА-
ВОВИЧ

(56) US 5,554,388 В 10.09.1996

RU 2198181 C2 10.02.2003

RU 2193879 C1 10.12.2002

(57) 1. Спосіб одержання фармацевтичної компо-
зиції, що містить інсулін на полісахаридному носії,
що включає змішування вихідних інгредієнтів, який
відрізняється тим, що на змішування подають
позитивно заряджений золь хітозану з рН, дорів-
нюючим 3,5-4,5, і негативно заряджений інсулін,
що не містить цинку, узятий у вигляді колоїдного
розчину або у вигляді нанорозмірних кристалічних
частинок, доводять рН змішаного золь до 5,5-6,5,
проводять гелювання та зневоднення гелю з одер-
жанням твердих часток розміром 10-100 мкм.2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ге-
лювання здійснюють за присутності альгінату на-

2

трію у змішаному золі у кількості, що не перевищує
5 % мас., з розрахунку на суху речовину.3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що змі-
шування вихідних інгредієнтів здійснюють з розра-
хунку масового відношення інсуліну до хітозану у
змішаному золі, дорівнюючого (0,2-0,8):1, при за-
безпеченні електронейтральності змішаного золь.4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на
змішування подають позитивно заряджений золь
хітозану в ацетатному буферному розчині з розмі-
ром частинок хітозану 200-400 нм.5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на
змішування подають позитивно заряджений золь
хітозану у вигляді його хлоргідрату, що має моле-
кулярну масу 80-120 kDa та ступінь деацетилю-
вання 85-89 %.6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на
змішування подають інсулін у вигляді кристалічних
частинок з розміром 800-1200 нм.7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на
змішування подають колоїдний розчин інсуліну у
фосфатному буфері з рН, що дорівнює 8,0-9,0.8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на
змішування подають хроматографічно очищений
генноінженерний інсулін, одержаний з використан-
ням Штаму ESCHERICHIA COLI XLI-BLUE/PINSR
як продуцента ПРЕПРОІНСУЛІНУ.9. Фармацевтична композиція уповільненого виві-
льнення для перорального використання, що міс-
тить інсулін на носії - хітозані, яка **відрізняється**
тим, що вона одержана способом, охарактеризо-
ваним у будь-якому з пунктів 1-7.

Запропонований винахід стосується галузі
одержання лікарських засобів, що містять активно
діючу речовину, сполучену з носієм, і може бути
використаний для одержання препаратів з регу-
льованим вивільненням інсуліну.

Останнім часом велика увага приділяється ро-
зробці фармацевтичних препаратів, що забезпе-

чують контрольоване виділення діючої речовини,
підбору носіїв для активних лікарських речовин і
розробці методів одержання препаратів у зручній
для пацієнта лікарській формі.

Однією з активних лікарських речовин, для
яких такі розробки особливо необхідні, є інсулін.

(19) UA (11) 90013 (13) C2

Відомий спосіб одержання стабільної сухої порошкоподібної інсулінової композиції для перорального застосування, що включає розчинення інсуліну та фармацевтичного носія у водному буфері з подальшим сушінням розпилюванням з одержанням аморфних часток із середнім розміром 0,1-10 мкм та вмістом води менше 10%, при цьому як носій використовують вуглеводи з групи, що складається з маніту, рафінози, лактози, мальтодекстрину, або органічні солі натрію, такі як цитрат, глюконат, аскорбат (RU 2175556, 20.02.1999).

Однак одержаний порошкоподібний засіб призначений тільки для адсорбції інсуліну через легені.

Відома композиція для носового введення інсуліну, де як носій використовують агреговану кристалічну целюлозу із специфічним гранулометричним розподілом (RU 2299743, 27.05.2007).

Відома фармацевтична композиція для перорального застосування, що містить інсулін на носії-поліетиленоксиді з молекулярною масою 0,4 - 40 кДа, який попередньо опромінюють високоенергетичним опромінюванням, а потім вводять інсулін до його концентрації за білком 1-10 мг/мл та при співвідношенні поліетиленоксид-інсулін, дорівнюючому (1-500):1, і перемішують з одержанням прозорого або злегка опалесцювального розчину (RU 2316339, 10.02.2008).

Проте одержаний препарат не має властивості регульованого вивільнення активної речовини.

Для виготовлення лікарських форм уповільненого вивільнення найбільш перспективними є полімерні біоруйновані носії.

Відомий, наприклад, біоруйнований триблоковий полімер з середньою молекулярною масою 2000-4990 Дальтон, що має властивості оборотного термічного желатинування, тобто існуючий у вигляді водного розчину при низьких температурах, та утворює гель при фізіологічно підходящих температурах. Полімер містить біоруйнований гідрофобний складний поліефір на основі різних мономерів і біоруйнований гідрофільний полімерний блок з поліетиленгліколю, в який можна ввести інсулін (RU 2232779, 20.07.2004).

Відомий також спосіб виготовлення мікрочасток для уповільненого вивільнення речовини, у якому склад, що містить активну речовину, диспергують в органічному розчині полімеру, а одержану суміш додають у зовнішню фазу у вигляді водного розчину або масляної фази, після чого видаляють розчинник під тиском або у потоці інертного газу. При цьому склад з активною речовиною може містити хітозан із ступенем деацильовання 25-100% та молекулярною вагою 10000 - 2000000 Да, розчинений в оцтовій кислоті. В результаті здійснення способу можуть бути одержані кулясті мікрочастки з діаметром 1-500 мкм. (RU 2291686, 20.01.2007).

Відомий спосіб, згідно з яким обирають похідне хітозану з урахуванням типу та числа його заряджених груп, обирають також форму діючої речовини, таким чином, щоб при певному рівні pH забезпечувалося вирівнювання зарядів діючої речовини та носія у препараті. З обраного похідного хітозану одержують водний золь, що містить діючу

речовину, потім регулюють pH водного золю до досягнення ізоіонного стану з можливим осадженням колоїдних часток або наночасток діючої речовини і одержаний водний золь піддають сушінню (RU 2256440, 10.10.2003).

Незважаючи на те, що список активних речовин, придатних для вказаних вище способів, включає інсулін, умови, за яких можливе одержання препарату із уповільненим вивільненням інсуліну для перорального використання, у патентах не розкриті. Відомі способи указують лише на можливість одержання наночасток діючої речовини на хітозановому носії.

За прототип запропонованого винаходу прийнятий спосіб одержання фармацевтичної композиції, що містить інсулін на полісахаридному носії, який включає змішування вихідних інгредієнтів, за які беруть суспензію хітозану у фосфатному буферному розчині з pH 7,3 - 7,4 або з pH = 4 і натрієвий інсулін у фосфатному буферному розчині з pH 7,3 - 7,4 або з pH = 4, розчини змішують в об'ємному співвідношенні 1:1 та вводять соляну кислоту до утворення розчинного комплексу інсуліну з хітозаном з pH 3,6 - 4,4. Запропонований засіб призначений для назального застосування, або як вакцина (US 5554388, 10.09.1996).

Недоліком відомого способу є відсутність стабільності, що приводить до одержання композиції з великою відмінністю властивостей. Спосіб не придатний також для одержання лікарської форми для перорального використання, що характеризується регульованим вивільненням інсуліну.

Препарати, що вводяться перорально, проходять через стравохід, шлунок і кишечник (органи, які мають різну кислотність середовища та різні ферменти), що ускладнює розробку ефективних засобів для перорального приймання. Інсулін при пероральному введенні розщеплюється на амінокислоти і малі пептиди, які швидко розкладаються в епітелії тонкої кишки амінопептидазою, що ослабляє дію препарату та знижує ефективність регульованого вивільнення.

Задачею даного винаходу є розробка способу одержання інсуліну на носії для перорального введення, що забезпечує одержання фармацевтичної композиції уповільненого вивільнення, яка характеризується стабільністю властивостей.

Поставлена задача вирішується заявленим способом одержання фармацевтичної композиції, яка містить інсулін на полісахаридному носії, включаючим змішування вихідних інгредієнтів, за які беруть позитивно заряджений золь хітозану з pH, дорівнюючим 3,5 - 4,5, і негативно заряджений інсулін, що не містить цинку, у вигляді колоїдного розчину або у вигляді нанорозмірних кристалічних часток, доводять pH змішаного золю до 5,5 - 6,5, проводять гелювання та зневоднення гелю з одержанням твердих часток розміром 10-100 мкм.

Переважно, гелювання здійснюють за присутності альгінату натрію у змішаному золі в кількості, що не перевищує 5% мас, з розрахунку на суху речовину.

Передбачено, що змішування вихідних інгредієнтів здійснюють з розрахунку масового відношення інсуліну до хітозану у змішаному золі, дорівню-

ючого (0,2-0,8): 1, при забезпеченні електронейтральності змішаного золю.

Переважаю, на змішування подають позитивно заряджений золь хітозану в ацетатному буферному розчині з розміром часток хітозану 200-400 нм.

Переважаю, на змішування подають позитивно заряджений золь хітозану у вигляді його хлорідрату, що має молекулярну масу 80 - 120 kDa та ступінь деацетилювання 85-89%.

На змішування подають інсулін у вигляді кристалічних часток з розміром 800-1200 нм або колоїдний розчин інсуліну у фосфатному буфері з pH 8,0 - 9,0.

У кращому варіанті на змішування подають хроматографічно очищений генно-інженерний інсулін, одержаний з використанням Штаму *ESCHERICHIA COLI XLI-BLUE/PINSR* як Продукцент ПРЕПРОІНСУЛІНУ.

Поставлене завдання вирішується також запропонованою фармацевтичною композицією уповільненого вивільнення для перорального використання, що містить інсулін на носії-хітозані, одержаною охарактеризованим вище способом

Запропоновані нами параметри способу одержання встановлені експериментально. Суттєві ознаки способу, введені у незалежний пункт формули, є необхідними для забезпечення стійкості золю носія-хітозану, одержання стабільного змішаного нанозолю з високим ступенем однорідності та можливістю його гелювання до одержання стабільного, здатного до перетворення на наночастки, високо структурованого ксерогелю без втрати активності діючої речовини. З одержаних часток ксерогелю можна формувати лікарські форми за допомогою відомих методів, як у вигляді таблеток та пілюль, так і у вигляді капсул.

Нижче наведені конкретні приклади здійснення винаходу.

Приклад 1.

Для одержання позитивно зарядженого золю хітозану використовують частки хлорідрату хітозану, деацетилюваного до ступеня 87 %, що мають молекулярну масу 100 kDa, середній розмір часток 300 нм, дзета-потенціал +50 mV.

Обрані частки хітозану інтенсивно перемішують з ацетатним буферним розчином з pH=4,0, приготовленим на бідистильованій воді, із забезпеченням мольного відношення іонів водню (H⁺) до глюкозамінічних ланок хітозану (GLCN), дорівнюючого (0,5-1):1. Кількість позитивно заряджених центрів на поверхні хітозану (густина позитивного заряду) залежить від ступеня протонування аміногруп хітозану. Дзета-потенціал часток золю склав +50 mV.

Na-інсулін одержаний з використанням Штаму *ESCHERICHIA COLI XLI-BLUE/PINSR* як Продуктента ПРЕПРОІНСУЛІНУ відповідно до патенту RU 2148642, 2000 та патенту UA 24452, 2003.

50 мл приготовленого позитивно зарядженого золю хітозану з концентрацією 10 мг/мл змішують з 50 мл колоїдного розчину Na-інсуліну, що має негативний заряд і суспендований у фосфатному

буферному розчині з pH=9,0, при концентрації інсуліну 5 мг/мл, тобто при масовому відношенні інсулін: хітозан, дорівнюючому 0.5:1. Доводять pH змішаного золю до 6,0 і витримують протягом 10 хвилин до одержання стійкого електронейтрального гелю.

Одержаний гель піддають зневодненню шляхом сушіння сублімації з одержанням ксерогелю із розміром часток від 10 до 50 мкм.

В результаті одержана фармацевтична композиція: інсуліно-хітозановий комплекс при вмісті інсуліну 190 IU/ml, що має ефект уповільненого вивільнення і рекомендований для перорального використання.

Приклад 2.

Спосіб здійснений з використанням позитивно зарядженого золю ацетату хітозану із ступенем деацетилювання 85%, що має середній розмір часток 400 нм, молекулярну масу 80 kDa, які дисперговані в ацетатному буфері з pH 3,5. Негативно заряджені кристалічні частки людського біосинтетичного інсуліну з розміром 800-1200 нм вводять у золь хітозану при інтенсивному перемішуванні та масовому відношенні інсуліну до хітозану, дорівнюючому 0,2:1, додають альгінат натрію у кількості 5% мас, додають луг до pH 5,5 і продовжують перемішування протягом 3 хвилин. Одержаний електронейтральний гель піддають розпилювальному сушінню і одержують тверді частки інсуліно-хітозанового комплексу з розміром 50-100 мкм.

Приклад 3.

Спосіб здійснений так само, як і у прикладі 1, з використанням позитивно зарядженого золю глютамату хітозану із ступенем деацетилювання 89%, що має середній розмір часток 200 нм, молекулярну масу 120 kDa, які дисперговані в ацетатному буфері з pH 4,5. Дзета-потенціал часток золю склав +35 mV. На змішування із золем поданий колоїдний розчин свинячого інсуліну у фосфатному буфері з pH 9,0, при масовому відношенні інсулін: хітозан, дорівнюючому 0,8:1. Після встановлення pH змішаного золю 6,5 і витримки системи до одержання електронейтрального стійкого гелю продукт подрібнюють на кульовому млині і висушують. Одержано інсуліно-хітозановий комплекс при вмісті інсуліну 220 IU/ml, з розміром часток 10-100 мкм, що має ефект уповільненого вивільнення.

Одержана фармацевтична композиція перевірена на мишах.

Моніторинг кінетики вивільнення інсуліну з одержаної фармацевтичної композиції проведений за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою та градієнтним елюванням. Дані щодо безперервного вивільнення інсуліну подані на фігурі 1 у вигляді графічної залежності кількості інсуліну від часу.

Аналіз результатів показав високу ефективність інсулін-хітозанового комплексу, одержаного запропонованим способом, для орального застосування. Одержаний засіб показав добре регульоване вивільнення інсуліну протягом 7-8 діб.

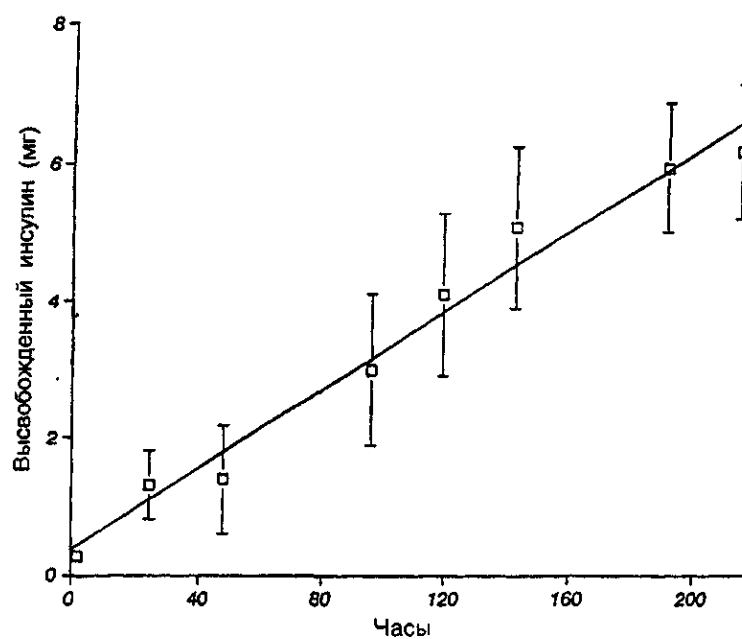


Fig. 1