



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76393 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 9/127

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 47/44

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 31/00

A61P 35/00

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

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОГО ЗАСОБУ, ЩО МІСТИТЬ КВЕРЦЕТИН

1

2

(21) а200604675

(22) 27.04.2006

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Стефанов Олександр Вікторович, Григор'єва Ганна Савівна, Соловійов Анатолій Іванович, Пасечнікова Наталія Володимирівна, Хромов Олександр Станіславович, Конахович Наталія Філімонівна, Краснопольський Юрій Михайлович

(73) ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, Стефанов Олександр Вікторович, Григор'єва Ганна Савівна, Соловійов Анатолій Іванович, Пасечнікова Наталія Володимирівна, Хромов Олександр Станіславович, Конахович Наталія Філімонівна, Краснопольський Юрій Михайлович

(56) UA C2 46528 15.05.2002

UA C2 38504 15.05.2001

RU C1 2181051 10.04.2002

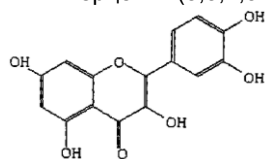
SU 701640 05.12.1979

UA C2 69303 16.08.2004

(57) Спосіб отримання ліпосомального засобу з фармакологічною дією шляхом змішування розчину фосфатидилхоліну в етиловому спирті із розчином фізіологічно активної речовини при масовому співвідношенні (фосфатидилхолін:фізіологічно активна речовина) 1:0,01-0,10, висушування суміші у вакуумі, її емульгування у водному середовищі, диспергування емульсії з додаванням лактози у вигляді водного розчину, поетапної фільтрації, стерилізуючої фільтрації і ліофільного висушування, який **відрізняється** тим, що як фізіологічно активну речовину застосовують кверцетин, який розчиняють у спирті етиловому при температурі 47-53°C, висушування суміші розчинів проводять при температурі 42-50°C, а масове співвідношення кверцетин:лактоза складає 1:24-30.

Винахід належить до фармації і стосується способу отримання ліпосомального засобу з фармакологічною дією, що містить фізіологічно активну речовину - кверцетин і має широкий спектр фармакологічних властивостей і може використовуватись у фармакотерапії, зокрема, в офтальмології і кардіології.

Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаоксифлавоон) - KB



Кверцетин

є представником класу флавоноїдних глікозидів. Для цієї фізіологічно активної речовини характерна виражена антиоксидантна, протизапальна,

протипухлинна, спазмолітична, антимікробна дія, а також здатність до стабілізації клітинних мембран [1].

За всієї значущості і перспективності фармакотерапевтичної поліфункціональності KB, створення його препаратів і лікарських форм обмежується та утруднюється через практичну нерозчинність кверцетину у водному середовищі і, відповідно, у фізіологічних рідин організму. Цей фактор обумовив створення переважно пероральних засобів кверцетину (порошок, гранули), для яких, тим не менш, характерна нестабільність активної субстанції у шлунковому тракті, що у поєднанні із низькою розчинністю, обумовлює вкрай низьку біодоступність.

Доцільність поширення застосування KB у медичній практиці актуалізувала розробку способів

(13) C2

(11) 76393

(19) UA

отримання засобів кверцетину, які відповідають умовам відмінного від перорального шляху введення.

Відомий спосіб одержання ін'єкційного засобу на основі КВ, який включає розчинення кверцетину у воді для ін'єкцій при температурі (75-85)°C в присутності натрію тетраборату, трилону Б і полівінілпіролідону при співвідношенні (мас. ч.) 1:(0.7-1.0):(5.5-8.0):(0.01-0.015), охолодження, фільтрацію та ампулювання отриманого розчину з наступною термічною стерилізацією ампул [Патент РФ №2181051, МПК⁷ А61К33/22, А61К9/08, А61К31/351, А61К31/79, А61К31/198, 2002] [2]. Недоліками цього способу є операція термічної стерилізації і розширений компонентний склад, що не тільки ускладнює технологічний процес, але й сприяє нестабільності цільового продукту, а також високий (70-90%) кількісний вміст допоміжних речовин, що погіршує якість цільового продукту з огляду на відому специфічну шкідливість трилону Б і полівінілпіролідону.

Відомий також спосіб одержання засобу КВ з кардіопротекторною дією для парентерального введення, який передбачає розчинення КВ у розчині полівінілпіролідону у 95%-ному спирті етиловому при співвідношенні полівінілпіролідон:КВ (мас. ч.) 9:1, нейтралізацію, стерилізацію, дозування розчину у флакони та ліофілізацію [Патент України №38504, МПК⁷ А61К9/14, А61К31/79, А61К31/455, 2001] [3]. Ґрунтовним недоліком цього способу є можливість його відтворення лише у присутності до 90% полівінілпіролідону, який обмежено виводиться з організму людини, накопичуючись у печінці і нирках. Останній фактор обумовив вкрай насторожене ставлення до парентеральних препаратів, які містять полівінілпіролідон, аж до обмеження їх клінічного застосування у багатьох країнах.

Вказані недоліки відомих способів отримання засобів на основі КВ обумовлюють зниження біодоступності і нешкідливості цільового продукту, тобто його якості, а звідси - неоптимальну фармакологічну дію.

Критеріями створення оптимальних парентеральних засобів з використанням гідрофобних або малорозчинних фізіологічно активних субстанцій є адекватні способи отримання ліпосомальних продуктів, створених на основі фосфоліпідів - основних компонентів ліпідного матрикса клітинних мембран [4].

Відомий спосіб отримання ліпосомального засобу на основі природного фосфатидилхоліну (ФХ - яєчного лецитину) і фізіологічно активної сполуки - комплексу трис-[N-2,3-диметилфенілантранілато]алюмінію [Патент України №46528, МПК А61К9/127, А61К31.14, А61К33/06, 2003] [5]. Цей спосіб обраний прототипом заявляемого об'єкту - способу як найбільш близький його аналог за сумою ознак, а саме: суттю і послідовністю основних операцій і заходів та ліпосомальною організацією цільового продукту, що має фармакотерапевтичну активність.

Спосіб за прототипом передбачає створення суміші розчинів ФХ і фізіологічно активного комплексу алюмінію в різних органічних розчинниках (спирті етиловому і хлороформі, відповідно), ви-

далення розчинників випаровуванням у вакуумі, емульгування у водному середовищі при співвідношенні (мас. ч.) ФХ:водне середовище емульгування 1:(60-80), диспергування емульсії з додаванням водного розчину лактози, фільтрацію з послідовним зменшенням розміру пор фільтрів, стерилізуючу фільтрацію, з наступним розливом і ліофілічним висушуванням.

Тим не менш, спосіб-прототип за природою компонентів його реалізації не передбачає отримання засобу кверцетину, а за принципом відтворення - вимагає певних умов та операцій, які можуть визначати відносно зниження якості ліпосомального продукту, особливо враховуючи природу кверцетину з точки зору обмеженої розчинності, нестійкості у розчині та інших фізико-хімічних властивостей.

По-перше, це стосується застосування при здійсненні прототипу двох органічних розчинників, одним з яких є хлороформ, що здатний провокувати часткове окислення ліпосом ще в процесі здійсненні способу-прототипу, а як залишкова домішка - негативно впливати на нешкідливість цільового продукту. По-друге, здійснення стадії розчинення компонентів без нагрівання, а наступного видалення розчинників під вакуумом при температурі не вищій 40°C - збільшує тривалість цих операцій, а відповідно - часу перебування інгредієнтів у розчині до включення у ліпосоми, сприяючи їх окисленню/розкладу. По-третє, спосіб-прототип передбачає введення лактози у майже 75-разовому надлишку по відношенню до активного компоненту (ФАР), що призводить до штучного підвищення вмісту нефізіологічної допоміжної речовини у цільовому продукті.

Вказані обставини знижують ефективність способу-прототипу щодо процесу його відтворення, а також щодо стабільності та якості цільового продукту - ліпосомального засобу з фармакологічними властивостями.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу створення способу отримання ліпосомального засобу кверцетину, що забезпечує підвищення якості цільового продукту за фармакотерапевтичною ефективністю, стабільністю та адекватністю різним способам введення до організму. Реалізація цієї задачі досягається запропонованим способом отримання ліпосомального засобу на основі композиції певних співвідношень фосфатиділхоліну і кверцетину.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання ліпосомального засобу, який включає створення розчину суміші ФХ і фізіологічно активної речовини при співвідношенні ФХ:ФАР (мас.ч.) 1:(0.01-0.10), видалення розчиннику випаровуванням, емульгування суміші у водному середовищі, диспергування емульсії з додаванням водного розчину лактози, поетапну фільтрацію, стерилізуючу фільтрацію, розлив та ліофілічне висушування з герметичним закриванням, згідно із винаходом, в якості ФАР використовують кверцетин, який розчиняють у спирті етиловому при температурі (47-53)°C, висушування суміші проводять при температурі у вакуумі (42-50)°C, а при додаванні лактози додержуються співвідношення КВ:лактоза (мас.ч.) 1:(24-30).

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

Приклад 1 - Заявляємий об'єкт. Точну наважку 20г КВ (субстанція "Кверцетину дигідрат" [6]) розчиняють у 2л спирту етилового при температурі 50°C і додають до розчину 800г ФХ ("лецитинове масло" - "лецетин-стандарт" [7], випарений до постійної ваги) у 2.0л спирту етилового. Розчин суміші ретельно перемішують і переносять у круглодонну скляну колбу, яку вміщують на ротаційний випаровувач, і видаляють спирт етиловий у вакуумі при температурі 42°C. По закінченні процесу висушування у колбу протягом 5хв. пропускають інертний газ. Отриману ліпідну плівку із стінок колби кількісно знімають приблизно 3л води для ін'єкцій і переносять в скляну ємність. Після повного зняття плівки у скляну ємність додають воду для ін'єкцій до загального об'єму рідини 15л, струшують і перемішують протягом 2-3год. до отримання однорідної емульсії. Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску α -Laval, додають 12.6л води для ін'єкцій і піддають диспергуванню при тиску 60МПа і температурі (40-45)°C з контролем оптичної густини рідини, що гомогенізується. При досягненні показника оптичної густини 0.15 (довжина хвилі 540нм; товщина шару поглинання $1=0.5\text{см}$) до отриманої емульсії додають стерильний розчин 480г лактози (молочний цукор фармакопейний) у 2.4л води для ін'єкцій. Продовжують диспергування в реакторі гомогенізатора високого тиску до досягнення показника оптичної густини емульсії, не вищого 0.15 (при тих же умовах вимірювання).

Отриману емульсію послідовно фільтрують на установці Millipore, спочатку через мембрани 0.45мкм і 0.22мкм, а далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах у скляні флакони. Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню та проводять ліофільне (сублімаційне) висушування в установці ТГ-50. Після висушування флакони із ліпосомальним продуктом продувають інертним газом, закривають і герметизують в асептичних умовах.

У прикладах 2-5 операції та заходи за способом, що заявляється, здійснюють відповідно до прикладу 1. Зміни відображені в таблиці 1.

Цільовий продукт є легкою аморфною масою яскравого світло-жовтого кольору з характерним запахом.

Приклад 6. - Прототип за [41. Точну наважку 500г ФХ ("лецитинове масло" - "лецетин-стандарт" [6], випарений до постійної ваги) розчиняють у 250мл спирту етилового. До отриманого розчину додають розчин точної наважки 6.75г трис-[N-2,3-диметилфенілантранілато]алюмінію (субстанція препарату "Антраль") у 600мл хлороформу. Розчин суміші переносять у круглодонну скляну колбу, яку вміщують на ротаційний випаровувач, і видаляють розчинники у вакуумі при температурі (30-40)°C. По закінченні процесу випаровування розчинників у колбу протягом 5хв. пропускають інертний газ. Отриману ліпідну плівку із стінок колби кількісно знімають порціями приблизно по 250мл води для ін'єкцій і переносять в скляну ємність.

Після повного зняття плівки у скляну ємність додають воду для ін'єкцій до загального об'єму рідини 15л, струшують і перемішують до отримання однорідної емульсії. Емульсію переносять у реактор гомогенізатора високого тиску α -Laval, додають 12л води для ін'єкцій і піддають диспергуванню при тиску 60МПа і температурі (40-45)°C з контролем оптичної густини рідини, що гомогенізується. При досягненні показника оптичної густини не більше 0.15 (довжина хвилі 540нм; товщина шару поглинання $1=0.5\text{см}$) до отриманої емульсії додають стерильний розчин 505г лактози (молочний цукор фармакопейний) у 3л води для ін'єкцій. Продовжують диспергування в реакторі гомогенізатора високого тиску до досягнення показника оптичної густини емульсії не більше 0.15 (при тих же умовах вимірювання).

Отриману емульсію послідовно фільтрують на установці Millipore, спочатку через мембрани 0.65мкм і 0.22мкм, а далі піддають стерилізуючій фільтрації та дозовано розливають в асептичних умовах у скляні флакони. Флакони з емульсією піддають інтенсивному заморожуванню та проводять ліофільне (сублімаційне) висушування в установці ТГ-50. Після висушування флакони із ліпосомальним продуктом продувають інертним газом, закривають і герметизують в асептичних умовах.

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

У таблиці 1 наведені параметри здійснення операцій за способом, що пропонується, і способом-прототипом. Для ідентифікації і підтвердження якості цільових ліпосомальних засобів, отриманих запропонованим способом, їх використовували у вигляді емульсії, отриманій шляхом додавання у флакони із ліофілізованим продуктом стерильного 0.9% розчину натрію хлориду ізотонічного і адекватної форми його фармакотерапевтичного застосування.

Ефективність заявляемого способу за якісною і кількісною ідентифікацією у цільовому продукті ліпідного компонента (ФХ) підтверджена:

- методом тонкошарової хроматографії на пластинці за хроматограмою розчину цільового продукту в етиловому спирті, на якій основна пляма жовтого кольору виходить на рівні основної плями розчину стандартного зразка лецитину;

- спектофотометричним методом за величиною оптичної густини при довжині хвилі 820нм продуктів кольорової реакції продукту, обробленого пергідролем в присутності сірчаної кислоти, з амонію молібдатом (визначення фосфору);

- за показником індексу окислювання ліпідної фракції ліпосом цільового продукту у порівнянні із стандартним зразком лецитину.

Ефективність заявляемого способу за якісною і кількісною ідентифікацією у цільовому продукті кверцетину (КВ) підтверджена:

- спектофотометричним методом за характеристичним УФ поглинанням розчину цільового продукту в етиловому спирті при довжинах хвиль (257 \pm 2)нм і (375 \pm 2)нм і величиною оптичної густини при довжині хвилі (375 \pm 2)нм у порівнянні із ста-

ндартом - розчином кверцетину.

Ефективність способу, що пропонується, за статусом цільового продукту як замкнених фосфатиділхолінових ліпосом із внутрішньою водною порожниною, які містять KB, доведена:

- методом діаліза емульсії ліофілізованого продукту в фізіологічному розчині з радіоізотопним маркером ^{22}Na в нормотонічних (проти фізіологічного розчину) або гіпотонічних (проти бідистильованої води) умовах із визначенням різниці вмісту мітки ^{22}Na у вихідній емульсії і після видалення її частини, яка не включилася у ліпосоми;

- методом гель-фільтрації емульсії на колонці із Сефадексом G-25 (елюат - фізіологічний розчин) із контролем виходу ліпосомального продукту за характеристичною смугою поглинання в області 540nm, яка відображає дисперсний склад ліпосом.

- методом ІЧ-спектроскопії шляхом порівняння характерних змін у спектрі цільового продукту порівняно з ФХ і KB.

Крім того, визначали осмоляльність ліпосомального засобу і його активність в тесті агрегації тромбоцитів *in vitro*, маючи на увазі адекватність цільового продукту, створеного за запропонованим способом, вимогам до офтальмологічних і парентеральних лікарських засобів, відповідно.

Згідно із результатами фізико-хімічної ідентифікації заявляємий спосіб забезпечує якість і стабільність цільового продукту як ліпосом (ФХ+KB) із супрамолекулярними зв'язками між компонентами композиції (таблиця 2), а саме:

- компоненти композиції включаються у ліпосомальну структуру і кількісно співпадають до та після гель-фільтрації;

- кількість мітки ^{22}Na співпадає у вихідних і перероблених ліпосомах; швидкість виходу ^{22}Na зростає у гіпотонічних умовах;

- за даними хімічного аналізу, ТШХ та УФ-спектроскопії, склад і природа ФХ і кверцетину в ліпосомах зберігаються і збігаються з такими для стандартів: лецитину і кверцетину;

- аналіз характерних змін в ІЧ-спектрі цільового продукту у порівнянні із стандартами лецитину і кверцетину підтверджує входження KB до фосфоліпідного шару ліпосом за участю π -електронних зв'язків і можливої комплементарної чи стекінг-взаємодії: зниження інтенсивності поглинання $1650\text{-}1590\text{см}^{-1}$ (для дієнових $\sqrt{C=C}$ систем; деформаційних коливань δ_{OH} , $\delta_{\text{C-H}}$), поява триплету (1650 , 1630 і 1590см^{-1}) у місці знаходження єдиної смуги деформаційних коливань 1640см^{-1} у спектрі ФХ, значні відмінності на ділянці площинних $\delta_{\text{OH}+\text{OC-H}}$ ($1390\text{-}1350\text{см}^{-1}$) і позаплощинних $\delta_{\text{C-H}}$ ($900\text{-}650\text{см}^{-1}$) деформаційних коливань.

Реалізація способу, що пропонується при відмінних від вказаних у прикладах 1-3 параметрах операцій (приклади 4 і 5), а також за способом-прототипом обумовлює зниження якості і стабільності цільового продукту, а саме:

- неоднорідність розміру ліпосом;
- збільшення індексу окислювання ліпосомального продукту;

- зменшення стабільності емульсії, відтвореної з ліофілізованого продукту (за візуальним розшаруванням);

- неповне включення KB до цільового продукту

або його перенавантаження нефізіологічним ексципієнтом (лактоза);

- підвищення рівню впливу ліпосомального засобу на агрегацію тромбоцитів *in vitro* (як тест на відповідність парентеральному способу застосування).

Крім того, осмоляльність емульсії цільового продукту знаходиться у межах, встановлених фармакопеею для офтальмологічних засобів ($214\text{-}434\text{мосмоль/кг}$), тоді як для продукту за способом-прототипом - дещо перевищує максимально допустимий показник.

Таким чином, спосіб, що пропонується саме за прикладами 1-3 забезпечує створення цільового продукту, який за фізико-хімічною якістю відповідає фармацевтичним вимогам до лікарських препаратів, у т.ч. офтальмологічних і парентеральних.

Відповідно до задачі винаходу, якість цільового продукту - ліпосомального засобу кверцетину - оцінено за показниками фармакотерапевтичної якості в офтальмології і кардіології при субкон'юнктивальному (краплі) і внутрішньовенному (ін'єкції) способі введення, відповідно.

У експериментальних доклінічних дослідженнях порівняння цільових продуктів, отриманих за запропонованим способом (приклади 1-5) і способом-прототипом, здійснювали у двох моделях: 1) за динамікою показника агрегації тромбоцитів в крові гіпертензивних самців щурів (АГ), яким внутрішньочеревно (адекватно внутрішньовенному клінічному застосуванню) вводили емульсію ліофілізованих продуктів (15 мг/кг) у фізіологічному розчині, двічі на добу протягом 3-х діб; 2) динамікою репарації рогівки кролів при травматичному кератиті, яким робили інстиляції емульсії (0.06мл) у кон'юнктивальний мішок правого ока 4 рази на добу (ліве око - інтактний контроль). У всіх експериментальних групах (у т.ч. контрольній) було по 6-9 тварин.

В таблиці 3 наведена оцінка ефективності способу, що заявляється, за показниками репараційної і протизапальної активності (офтальмологія) і протиагрегаційної дії (при АГ) цільового продукту у доклінічному експерименті. Застосовані ліпосомальні продукти покращують показники стану тварин, однак реалізація способу, що пропонується забезпечує якість цільового ліпосомального засобу, яка відповідає більш високому фармакологічному ефекту:

- активації і скороченню терміну репарації деенітелізованої зони травмованого ока (ранозаживлення);

- різкому ослабленню проявів запалення, що супроводжує травматичний кератит, в усіх структурах ока і віка;

- зниженню і нормалізації аномальної агрегації тромбоцитів, що супроводжує АГ.

Переваги способу, що пропонується, перед способом-прототипом за фармакотерапевтичним ефектом продуктів виявлені при обох експериментальних патологіях різного генезу. Це свідчить про те, що висока якість ліпосомального засобу (ФХ+KB), підтверджена фізико-хімічними дослідженнями, створює найвищий політропний фармакологічний ефект. Така якість забезпечується при реалізації способу, що пропонується, згідно із

операціями і параметрами, які відрізняються від способу-прототипу і описуються прикладами 1-3, а саме: як фізіологічно активну речовину в ліпосомальному засобі використовують кверцетин, який розчиняють в спирті етиловому при температурі (47-53)°C, видалення розчинника у вакуумі проводять при температурі (42-50)°C, а масове співвідношення KB:лактоза складає (1:24):(1:30). При недотриманні цих параметрів (приклади 4 і 5, а також прототип - приклад 6) реалізація способу ускладнюється і пролонгується (таблиця 1), не забезпечуються фізико-хімічні характеристики, які ідентифікують цільовий продукт як стабільний ліпосомальний засіб (таблиця 2), і не забезпечується його висока політропна фармакологічна активність (таблиця 3).

Оптимальне сполучення технологічності способу, що пропонується, із стабільною фізико-хімічною і встановленою у доклінічних дослідженнях фармакотерапевтичною якістю і нешкідливістю отриманого цільового продукту повністю відповідає нормативним вимогам до створення і клінічного застосування лікарських засобів. Завдяки цьому, цільовий продукт, отриманий за способом, що пропонується, зареєстрований як новий препарат в двох лікарських формах (очні краплі та ін'єкції для внутрішньовенного введення), що дозволені до клінічного застосування в офтальмології і кардіології [8].

У клінічних дослідженнях оцінка ефективності способу, який пропонується, у порівнянні із прототипом, щодо фармакотерапевтичної активності цільових продуктів була неможлива з огляду на законодавчі і біоетичні фактори, які регламентують умови клінічних випробувань і клінічне застосування лікарських препаратів. Тому для коректної оцінки ефективності способу, який заявляється, при порівнянні клінічної активності створюваного продукту (приклад 1) використано функціональні аналоги - стандартні фармакотерапевтичні схеми, які реально застосовуються у лікуванні відповідних офтальмологічних і кардіологічних станів (але без препаратів, що містять кверцетин). Окремо в кардіологічній клініці нестабільної стенокардії порівняння проведене також із парентеральним препаратом, що містить KB [3].

В офтальмологічній клініці емульсією цільового продукту вводили 20 пацієнтам після оперативного втручання з приводу екстракапсулярної екстракції катаракти крапельно, 6 разів на добу з рівними проміжками часу у кон'юнктивальний мішок обох очей протягом 7 днів. В кардіологічній клініці цільовий продукт вводили струйно, внутрішньовенно 50 пацієнтам з установленим діагнозом нестабільної стенокардії/інфаркту міокарда без зубця Q в дозі 1.13г кожні 12 годин у перші 2 доби лікування, потім по 1.13г один раз на добу ще протягом 5 діб. Хворі з кожним з цих діагнозів були рандомізовані за станом, віком і статтю. Спостереження за хворими проводили протягом 15 діб.

Висновки про клінічну ефективність цільового продукту отримані на підставі порівняння показників суб'єктивного стану хворих і об'єктивного, у т.ч. апаратурного і лабораторного обстеження (таблиці 4 і 5). Проведені лікувальні заходи покращують всі аномально змінені показники стану пацієнтів,

але лише при здійсненні способу, що пропонується, якість цільового ліпосомального засобу (ФХ+KB) відповідає сталому високому рівню політропного фармакологічного ефекту:

- достовірно зменшується тривалість клінічних посттравматичних і запальних симптомів у хворих після екстракапсулярної екстракції катаракти в усіх структурах ока (рогівки, райдужки, кон'юнктиви і очного яблука), що вже на 4-у добу обумовлює нормалізацію стану 100% пацієнтів (стандартна терапія - 6-7 доба);

- достовірно покращуються об'єктивні характеристики серцевої діяльності у хворих з гострим коронарним синдромом за параметрами електростабільності міокарда, внутрішньосерцевої гемодинаміки і морфо-функціонального стану серця, що на закінчення спостереження обумовлює 100% виживаємість і позитивний прогноз пацієнтів;

- в 1.5-2 рази, у порівнянні з вихідними, покращуються кардіоспецифічні біохімічні показники у тих же хворих, у т.ч. різко спадає вираженість серцевого запального процесу за вмістом маркерів запалення, причому, їх позитивна динаміка спостерігається вже у найважливіші перші 12 годин фармакотерапії гострого коронарного синдрому, на відміну від стандартної терапії і препарату порівняння (на тлі яких у ці терміни патологічні процеси ще підсилюються).

Слід підкреслити, що, порівняно із стандартною терапією (і препаратом порівняння) застосування цільового продукту обумовило більш виразну позитивну динаміку всіх досліджених офтальмологічних і кардіологічних показників, прискорення досягнення повноцінного відновлення (після екстракції катаракти) або клініко-лабораторної ремісії (гострий коронарний синдром) і відсутність подальшого прогресу патологічного стану.

Побічні прояви у процесі лікування цільовим продуктом спостерігали у 2 % хворих на гострий коронарний синдром (гіпотонія і алергічний висип), але їх безпосередній зв'язок з препаратом клініцисти оцінюють як "не встановлений". В офтальмологічній клініці побічні прояви не відзначені.

Дані технологічного відтворення, фізико-хімічної ідентифікації, експериментальних фармакологічних досліджень і клінічної апробації дозволяють зробити висновок про те, що спосіб, що пропонується має значні переваги перед прототипом при вирішенні задачі отримання стабільного ліпосомального засобу, що має високу поліфункціональну фармакологічну активність. Створена за способом, що пропонується, ліпосомальна композиція фосфатиділхоліну і кверцетину має цінні фармакологічні властивості, за широтою, рівнем і динамікою проявів яких при експериментальних доклінічних дослідженнях вигідно відрізняється від ліпосомального продукту, отриманого за способом-прототипом, а при застосуванні в клініці офтальмологічних і кардіологічних захворювань - від відомих стандартних схем фармакотерапії і препарату порівняння, що містить KB.

Отримані результати обґрунтовують доцільність застосування способу, що пропонується, для реалізації шляху отримання сучасного ефективного ліпосомального засобу, який має широкий

спектр фармакологічної дії.

Література

1. Middleton E., Kandaswami C, Theoharides Theoharis C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer // Pharm.rev. - 2000. - Vol.52, N 4. - p.673-751.

2. Патент РФ №2181051, МПК⁷ А61К33/22, А61К9/08, А61К31/351, А61К31/79, А61К31/198, 2002.

3. Патент України №38504, МПК⁷ А61К9/14, А61К31/79, А61К31/455, 2001.

4. Ebrahim S., Peyman G.A, Lee P. Application of liposomes in ophthalmology // Surv. Ophtalm. - 2005. - Vol.50, N 2. - p.167-182.

5. Патент України №46528, МПК⁷ А61К9/127, А61К31.14, А61К33/06, 2003.

6. Кверцетин АНД до Реєстраційного посвідчення №Р.08.03/07178.

7. Лецитин-стандарт. АНД до Сертифікату державної реєстрації №96/03-300200000.

8. Ліпофлаво. Реєстраційне посвідчення №UA/3581/01/01 від 14.08.05, №UA/3053/01/05 від 7.04.05

Таблиця 1

Параметри здійснення процесу отримання ліпосомального засобу за способом, що пропонується, і за способом-прототипом

	№ прикладу					6 Спосіб-прототип
	Спосіб, що заявляється					
	1	2	3	4	5	
Співвідношення ФХ:ФАР* (мас.ч.)	1:0.025	1:0.010	1:0.100	1:0.009	1:0.112	1:0.025
Розчинник:						
Спирт етиловий(ФХ) + хлороформ(ФАР)	-	-	-	-	-	-
Спирт етиловий(ФХ,ФАР)	+	+	+	+	+	+
Температура розчинення ФАР, ° С	50	47	53	45	55	Кімнатн.
Температура видалення розчинника у вакуумі, ° С	42	45	45	40	50	30-40
Співвідношення ФАР*:лактоза (мас.ч.)	1:24	1:27	1:30	1:20	1:32	1:75
Час диспергування, хв.	27	27	30	27	36	40
Оптична густина емульсії після диспергування	0.08	0.09	0.12	0.09	0.15	0.15
Час фільтрації, год.	1.0	1.2	1.4	1.0	1.7	2

* ФАР - фізіологічно активна речовина у складі цільового продукту: кверцетин (спосіб, що заявляється), трис-[N-2,3-диметилфенілантранілато]алюміній (спосіб-прототип).

Таблиця 2

Характеристики якості цільового продукту, отриманого за способом, що пропонується, і за способом-прототипом, як ліпосомального засобу

	№ прикладу (відповідно до таблиці 1)					
	Спосіб, що заявляється					Спосіб-прототип
1	2	3	4	5	6	
Розмір ліпосом, нм	290±20	280±15	290±25	280±15	310±25	340±20
Замкнені ліпосоми:						
Вміст ²² Na (% від уведеного):						
вихідні ліпосоми	95.2	95.8	95.0	95.6	94.6	94.0
перетворені ліпосоми	94.2	94.3	94.4	94.3	93.2	93.5
Вихід ²² Na, %:						
нормотонічні умови	65	67	70	65	75	70
гіпотонічні умови	92	90	90	92	92	90
Співвідношення ФХ:ФАР* у ліпосомах (мас.ч.):						
до геліфільтрації	1:0.025	1:0.010	1:0.100	1:0.009	1:0.12	1:0.020
після геліфільтрації	1:0.025	1:0.010	1:0.099	1:0.009	1:0.10	1:0.019
Включення ФАР до ліпосом, % (від уведеного)	100	100	100	100	94	99
Індекс окислювання	0.29	0.30	0.30	0.31	0.40	0.43
Стабільність емульсії ** (до розшарування), год	6.2	6.0	6.0	5.9	5.7	5.7
ІЧ-спектри (см ⁻¹):						
Деформаційні коливання δ _{ОН} , δ _{С-Н}	1650 1630 1590 1410	1650 1630 1590 1410	1650 1630 1590 1415	1650 1630 1590 1410	1650 1630 1590 1415	1640
Площинні δ _{ОН} +ω _{С-Н} коливання	965	965	970	965	930	1390-1350
Позаплощинні коливання δ _{С-Н}	770	770	770	740	710	
Агрегація тромбоцитів in vitro, %	4.6±0.2	4.7±0.1	4.7±0.3	4.6±0.2	5.1±0.1	5.2±0.2
Осмоляльність емульсії**** мосмоль/кг	340	360	400	300	400	445

* ФАР - фізіологічно активна речовина у складі цільового продукту: кверцетин (спосіб, що заявляється), трис-[N-2,3-диметилфенілантранілато]алюміній (спосіб-прототип).

** Визначається для емульсії продукту, відтвореної шляхом емульгування вмісту одного флакону у 50мл стерильного ізотонічного розчину для ін'єкцій, яку зберігали при температурі 3-5°С.

*** Для офтальмологічних засобів осмоляльність має бути в межах (214-434)мосмоль/кг.

Таблиця 3

Ефективність способу, що пропонується, у порівнянні із способом-прототипом за показниками фармакологічної якості ліпосомального засобу в експериментальних моделях травматичного кератиту і артеріальної гіпертензії

Продукт реалізації способу за прикладом	Показники фармакологічної активності					
	Травматичний кератит				Рівень агрегації тромбоцитів при АГ, %	
	Ранозаживлення (площа рани, мм ²)		Запальна реакція ока (сума балів)			
	2 доба	5 доба	2 доба	5 доба		
Продукти реалізації способу, що пропонується						
1	45.0±1.6	6.9±1.1	4.9	2.8	4.74±0.14	4.55±0.20
2	43.9±1.7	6.0±0.6	3.8	2.5	4.60±0.16	4.44±0.21
3	41.7±1.5	4.8±0.8	2.1	2.5	4.09±0.14	3.89±0.26
4	36.8±1.8	8.0±1.2	6.2	4.0	5.00±0.36	4.82±0.16
5	45.9±1.6	6.8±0.7	5.0	3.9	4.81±0.16	4.40±0.20
Продукт реалізації способу-прототипу						
6	58.7	42.0	9.5	8.9	6.10±0.10	6.01±0.15
Інтактний контроль	0		0		4.0±0.10	
Патологія	63.6±0.1	43.3±0.1	12.6	23.7	6.17±0.12	6.22±0.10

Таблиця 4

Ефективність способу, що пропонується, за показниками лікувальної активності цільового ліпосомального продукту у хворих після екстракапсулярної екстракції катаракти з імплантацією задньокамерної ШОЛ у порівнянні із стандартної терапією

Симптом	Тривалість регресії основних суб'єктивних та об'єктивних симптомів запального процесу (дів) при застосуванні:	
	Продукт за способом, що пропонується	Стандартна терапія
Печія і свербіж в оці	3.0±0.5	4.7±0.3
Відчуття чужорідного тіла	3.7±0.4	5.3±0.4
Світло боязкість	2.1±0.3	3.6±0.4
Циліарна болісність	4.0±0.5	4.9±0.5
Набряк вік	4.1±0.7	5.9±0.5
Гіперемія кон'юнктиви	4.2±0.3	6.7±0.2
Набряк рогівки	1.7±0.4	2.9±0.5
Набряк райдужної оболонки	2.6±0.3	3.5±0.3

Таблиця 5

Ефективність способу, що пропонується, за показниками лікувальної активності цільового ліпосомального продукту у хворих з установленим діагнозом нестабільної стенокардії/інфаркту міокарда без зубця Q у порівнянні із стандартної терапією і препаратом порівняння

	Динаміка показників при застосуванні засобів:		
	Продукт за способом, що пропонується	Стандартна терапія	Препарат порівняння [3]
1	2	3	4
Параметри добового моніторингу ЕКГ			
Шлуночкова екстрасистолія (ШЕ), компл/доба			
До лікування	356.4±40.2	408.8±70.2	390.7±55.5
Закінчення спостереження	129.6±20.4	233.1±30.9	221.2±28.5
Шлуночкова тахікардія (ШТ), (3 і більше компл)/доба			
До лікування	9.4±2.5	10.7±5.9	9.6±3.3
Закінчення спостереження	1.8±0.9	5.2±1.6	3.6±1.4
Суправентрикулярна екстрасистолія (СВЕ), компл/доба			
До лікування	96.8±10.5	103.2±12.9	99.9±8.1
Закінчення спостереження	71.3±8.51	96.2±10.2	80.92±7.4
Суправентрикулярна тахікардія (СВТ), компл/доба			
До лікування	5.9±2.8	3.1±0.9	4.0±1.6
Закінчення спостереження	2.1±1.2	2.5±1.8	2.6±1.3
Депресія сегменту ST, епізод/доба			
До лікування	12.8±4.7	11.3±5.3	12.0±4.5
Закінчення спостереження	3.1±1.2	4.9±1.5	5.0±1.3
Параметри внутрішньосерцевої гемодинаміки і морфо-функціонального стану серця			
Кінцевий діастолічний об'єм лівого шлуночка (КДО), мл			
До лікування	147.4±5.0	140.8±3.4	141.9±4.5
Закінчення спостереження	128.2±2.8	166.1±6.9	150.0±7.0
Ліве передсердя, см			
До лікування	4.4±0.3	4.3±0.8	4.2±0.5
Закінчення спостереження	3.6±0.9	4.0±0.9	4.0±0.6
Фракція викиду лівого шлуночка, %			
До лікування	51.6±2.5	52.7±1.4	50.9±1.5
Закінчення спостереження	60.9±2.5	55.9±1.1	56.2±2.1
Специфічні біохімічні показники			

Продовження таблиці 5

Активність креатин-фосфокінази МВ фракції (КФК-МВ), ммоль/л			
До лікування (0 год)	35.74±6.10	40.92±10.00	36.22±8.01
Через 12 год	23.92±4.92	149.54±20.69	103.00±14.01
Через 24 год	15.77±2.85	67.83±4.73	50.22±18.34
Маркер запалення інтерлейкін-8 у сироватці (ІЛ-8), пг/мл			
До лікування	91.92±8.51	105.39±10.18	93.98±9.06
Закінчення спостереження	75.89±10.0	87.41±9.38	94.32±8.95
Маркер запалення С-реактивний протеїн сироватки (С-РП), мг/л			
До лікування	12.41±5.35	10.17±3.74	9.98±2.26
Закінчення спостереження	5.05±1.03	11.73±2.39	9.92±2.51