

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **022182**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2015.11.30 | (51) Int. Cl. <i>A61K 31/337</i> (2006.01)
<i>A61K 47/26</i> (2006.01)
<i>A61K 47/24</i> (2006.01)
<i>A61K 47/12</i> (2006.01)
<i>A61K 9/127</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201201591 | |
| (22) Дата подачи заявки
2012.12.24 | |

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДОЦЕТАКСЕЛА**

- | | |
|--|--|
| (43) 2014.06.30 | (56) RU-C2-2157200
CN-A-101322699
US-A1-20050019386
WO-A2-2007027941
US-A1-20110070295 |
| (96) 2012000270 (RU) 2012.12.24 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВ" (RU) | |
| (72) Изобретатель:
Шоболов Дмитрий Львович (RU),
Краснопольский Юрий Михайлович
(UA), Ульянов Андрей Михайлович,
Натыкан Алексей Андреевич, Тарасов
Вадим Владимирович, Балабаньян
Вадим Юрьевич, Швец Виталий
Иванович (RU), Прохоров Виталий
Валентинович (UA) | |
| (74) Представитель:
Ермакова Е.А. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к фармацевтике. Способ включает создание композиции фосфатидилхолина и доцетаксела, высушивание смеси, ее эмульгирование в водной среде, диспергирование эмульсии, гомогенизацию, добавление криопротектора, стерилизующую фильтрацию и лиофильное высушивание. Результатом реализации способа является достижение стандартности и стабильности полученных липосом (размер липосом представлен в узком диапазоне), содержащих доцетаксел, высокая инкапсуляция доцетаксела в липосомы, стабильность доцетаксела в процессе хранения и снижение токсического действия.

B1

022182

022182

B1

Изобретение относится к фармацевтике.

Хорошо известно использование таксанов [3, 5, 14], в частности доцетаксела, в качестве противоопухолевого агента для лечения больных онкологическими заболеваниями: местно-прогрессирующим или метастазирующим раком молочной железы, немелкоклеточным раком легких, метастазирующей карциномой яичников, метастазирующим раком предстательной железы. Доцетаксел представляет собой полусинтетическое вещество с химической формулой $C_{43}H_{53}NO_{14}$, которое получают из биомассы игл европейского тиса. Доцетаксел обладает уникальным механизмом действия и широким спектром противораковой активности. Препарат способствует накоплению тубулина в микротрубочках клеток и препятствует их распаду, что приводит к нарушению митоза и межфазовых процессов в опухолевых клетках. Кроме того, доцетаксел проявляет активность в отношении некоторых клеток, продуцирующих в чрезмерном количестве р-гликопротеин, который кодируется геном множественной резистентности. Применение доцетаксела при прогрессирующем раке во 2-й линии полихимиотерапии достаточно эффективно при большинстве солидных опухолей [5, 11, 14].

В то же время, доцетаксел отличается высокой токсичностью, проявляющаяся в ряде побочных действий: гематологические реакции, задержка жидкости, реакции со стороны пищеварительного тракта, нервной и сердечно-сосудистой систем, печени и др. По данным ряда авторов у больных, применявших доцетаксел, чаще отмечается нейтропения и их приходится госпитализировать и применять гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Кроме того, доцетаксел отличается крайне низкой растворимостью в воде, что затрудняет подбор подходящих форм дозировки и значительные технологические трудности при производстве. В настоящее время доцетаксел изготавливают и вводят на носителе, содержащем Твин-80 (полисорбат) и растворяют в 13,0% этиловом спирте. Стабильность доцетаксела, растворенного в этаноле, достаточно низкая и лекарственное средство разрушается в спирте в течение 4 ч. Необходимо также отметить, что Твин-80 представляет собой сложное соединение с трудно определяемой структурой молекул.

Одним из приоритетных направлений развития современных фармацевтических технологий является разработка и создание терапевтических систем направленного действия. Для решения этой задачи с успехом применяются наносомальные носители лекарственных веществ, которые способны увеличивать нацеленность действия и обеспечивают увеличение биодоступности. За последние годы появились сообщения о включении таксанов в наночастицы из различных полимерных носителей, пегилированные частицы и липосомы из природных и синтетических липидов [6, 7, 15, 16].

В литературе описано множество попыток преодоления ЛС составами низкой растворимости фармацевтических субстанций в водных растворителях. К сожалению, такие составы разрабатывают в основном на эмпирическом уровне и не хватает систематических количественных исследований того, как данные составы могут сделать растворимыми лекарственные субстанции. Нами ранее предложены лекарственные препараты на основе липосомальных композиций, в состав которых включены гидрофобные лекарственные субстанции: "Липофлавор", который представляет собой фосфатидилхолиновые ЛС с инкапсулированным в них биофлавоноидом - кверцетином, применяемый в виде инъекционной формы в кардиологии и виде глазных капель; "Лиолив", в составе которого гепатопротектор - антраль и другие лекарственные гидрофобные субстанции в липосомах [1, 12, 13]. Проведенные клинические исследования липосомальных препаратов на основе гидрофобных и гидрофильных субстанций продемонстрировали высокую фармакологическую активность в пульмонологии, онкологии, кардиологии, нефрологии, офтальмологии [5, 6, 9]. Более того, применение липосомальных форм цитостатиков (антрациклиновые антибиотики) [2] является перспективным направлением для преодоления лекарственной устойчивости к химиопрепаратам, а также снижения токсического действия свободных форм противоопухолевых препаратов на органы и ткани [8-10].

Известен способ получения липосомальной композиции на основе природного фосфатидилхолина и доцетаксела, который обладает противоопухолевой активностью [15]. Способ получения липосомальной композиции, который осуществляется в соответствии с [15], выбран прототипом заявляемого объекта - способа как наиболее близкий его аналог по сумме признаков, а именно сутью и последовательностью выполнения основных операций и приемов, химической природой фосфолипидов и доцетаксела, липосомальной организацией целевого продукта и близостью его фармакотерапевтических проявлений.

Известный способ [15] предусматривает смешивание фосфолипидного компонента в водной фазе с доцетакселом (субстанцией) или в органическом растворителе в присутствии натрия олеата, суспендирование при окружающей температуре, диспергирование через Microfluidics при 15.000 psi, добавление криопротектора (трегалоза) к липосомам до конечной концентрации 10%; использование полученного препарата как в жидком виде, так и после лиофилизации. Липосомы имели размер до лиофилизации не более 100 нм.

Однако способ получения по прототипу предусматривает операции и методы, которые затрудняют его реализацию и способствуют снижению качества липосомального продукта. Во-первых, это связано с использованием фосфатидилхолина сои, который является более окисленным продуктом по сравнению с фосфатидилхолином яичного желтка (индекс окисленности фосфатидилхолина сои - 0,35; индекс окисленности яичного фосфатидилхолина - не более 0,21). Во-вторых, введение в процессе гомогенизации в

эмульсию доцетаксела в порошкообразном виде (субстанция) без учета ее растворения ухудшает стабильность системы и может изменять образующуюся систему липосом. В-третьих, в способе [15] отсутствует буферная система, стабилизирующая доцетаксел в водном растворе. Кроме того, предлагаемая [15] система добавления трегалозы в липосомы не позволяет криопротектору находиться как внутри липосомы, так и в окружающем водном пространстве, что приводит к нестабильности продукта после лиофилизации.

Все это снижает эффективность способа-прототипа в процессе воспроизводства препарата, а также его стабильность в качестве целевого продукта как химиотерапевтического средства.

Задачей заявленного способа является упрощение процесса получения и повышение качества липосомального препарата по показателям стабильности как липосомальной структуры, так и стабильности фармакологически активной субстанции доцетаксела, при этом результат, полученный при решении поставленной задачи, состоит в достижении стандартности и стабильности полученных липосом (размер липосом представлен в узком диапазоне), содержащих доцетаксел, высокой инкапсуляции доцетаксела в липосомы, стабильности доцетаксела в процессе хранения и снижения токсического действия липосомального доцетаксела (в частности, более чем в три раза по сравнению с нелипосомальным аналогом).

Для достижения поставленного результата предлагается способ получения липосомального противоопухолевого препарата, включающий создание композиции фосфатидилхолина и доцетаксела, высушивание смеси, ее эмульгирование в водной среде, диспергирование эмульсии, гомогенизацию, добавление криопротектора, стерилизующую фильтрацию и лиофильное высушивание, при этом эмульгирование проводят в водной среде, содержащей лимонную кислоту в концентрации (0,33-0,39 мг/мл), гомогенизацию проводили в два этапа: первоначальный при 500 атм, последующий при 800 атм, добавление криопротектора - лактозы проводили дробно: первоначально при эмульгировании, а затем в процессе гомогенизации, при этом соотношение компонентов в полученном препарате доцетаксел:фосфатидилхолин:криопротектор находится в пределах 1:(18,0-25,0):(22-63) соответственно.

В общем виде, в процессе практической реализации способ предусматривает использование яичного фосфатидилхолина и доцетаксела в органических растворителях, удаление растворителя упариванием в вакууме, диспергирование полученной массы в водной среде с pH 5,4-5,8, диспергированием многослойных липосом при возрастающем давлении, добавлением криопротектора как в начале гомогенизации, так и при достижении размера липосом 150-200 нм, получение липосом размером 80-140 нм, стерилизующей фильтрации полученной липосомальной эмульсии, разлив во флаконы, лиофилизация и герметизация в атмосфере инертного газа (или азота).

Способ иллюстрируется графиками фармакокинетических профилей доцетаксела в печени, мозге, почках и сердце крыс (фиг. 1-4 соответственно).

Эффективность заявляемого способа по качественной и количественной идентификации в готовом продукте липидного компонента - фосфатидилхолина оценивали

методом тонкослойной хроматографии на пластинках по хроматограмме раствора целевого продукта в метаноле, на которой основное пятно желтого цвета находится на уровне основного пятна раствора стандартного образца фосфатидилхолина;

индекс окисленности липидов проводили УФ-спектроскопией при двух длинах волн: 233 и 215 нм.

Эффективность заявляемого способа по качественной и количественной идентификации в готовом продукте доцетаксела оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, которую проводили для количественного определения посторонних примесей и содержания доцетаксела в образцах препарата. Использовали хроматограф "Shimadzu", колонка хроматографическая размером 240×4,6 мм, C18 с размером частиц 5 мкм, подвижные фазы: подвижная фаза А - 0,35 г/л аммония ацетата pH 5,5; подвижная фаза В - ацетонитрил; скорость подвижной фазы - 1,6 мл/мин; детектирование при длине волны 232 нм; температура колонки 30°C.

Определение величины частиц липосом проводили на наносайзере Zetasizer Nano ZS, Malvern методом фотонной корреляционной спектроскопии. Размер частиц измеряли при помощи полупроводникового лазера при длине волны 375 нм.

Нижеследующие примеры иллюстрируют способ получения липосомального препарата Доцетаксела, а также варианты получения. Подразумевается, что хотя в подробном описании и конкретных примерах раскрыты предпочтительные варианты осуществления изобретения, они приведены лишь для наглядности, поскольку из описания, а также формулы изобретения для специалиста в данной области техники станут очевидными различные изменения и усовершенствования, не выходящие за пределы существа и объема изобретения.

Пример 1.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 3420 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной сме-

си с рН 5,62, в которой находилось 1,5 г лактозы (из необходимых 4,18 г) и 87,5 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,821 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышали 1,8%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего два цикла) составляло 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 200 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (2,78 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации - 0,814 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 148,4 нм - 92,1%, 27,78 - 7,9%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,793 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 97,4%. Объем стерильной эмульсии - 200 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 140,0 нм - 94,6%, 38,5 нм - 5,4%; рН - 5,65. Включение не менее 96,5%. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:18:22).

Пример 2.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4085 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с рН 5,66, в которой находилось 2,5 г лактозы (из необходимых 6,85 г) и 80,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,827 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,65%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего два цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 200 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (4,35 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации - 0,812 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 138,0 нм - 94,6%, 54,3 - 5,4%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,799 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 98,5%. Объем стерильной эмульсии - 202 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 146,0 нм - 92,6%, 54,5 нм - 7,4%; рН - 5,65. Включение не менее 96,5% доцетаксела. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:21,5:36).

Пример 3.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4750 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с рН 5,60, в которой находилось 5,0 г лактозы (из необходимых 11,97 г) и 75,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,817 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела - не превышали 1,65%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего два цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 200 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (6,97 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации - 0,814 мг/мл. Эмульсию

фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром - 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 141,4 нм - 90,1%, 43,6 - 9,9%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,800 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 97,0%. Объем стерильной эмульсии - 200 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 153,0 нм - 90,6%, 68,5 нм - 9,4%; pH - 5,72. Включение не менее 96,5%. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:25:63).

Пример 4.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4085 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с pH 4,8, в которой находилось 5,0 г лактозы (из необходимых 11,97 г) и 100,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,824 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,65%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление при первых двух циклах (всего четыре цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию в течение двух циклов при 800 атм до размера частиц не более 180 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (2,42 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. В данном примере количество циклов гомогенизации было на два больше, чем в примерах 1-3. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации - 0,818 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации - 147,4 нм - 91,2%, 69,78 - 8,8%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,756 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 92,42%. Объем стерильной эмульсии - 200 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 140,0 нм - 94,6%, 38,5 нм - 5,4%; pH - 4,95. Включение не менее 96,5%. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:21,5:63).

Пример 5.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4085 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с pH 6,56, в которой находилось 2,5 г лактозы (из необходимых 6,85 г) и 67,5 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,821 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,5%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего два цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 180 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (4,35 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации 0,804 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров, с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 148,4 нм - 92,1%, 27,78 - 7,9%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,798 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 99,25%. Объем стерильной эмульсии - 206 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом. Размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 140,0 нм - 94,6%, 38,5 нм - 5,4%; pH - 6,75. Включение не менее 96,5%. Хранение

препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало появление дополнительных примесей доцетаксела до 2,4%, что свидетельствует о нестабильности продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:21,5:36).

Пример 6.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4085 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с pH 5,66, в которой находилось 2,5 г лактозы (из необходимых 6,85 г лактозы) и 80,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,827 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,65%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего один цикл) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 200 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (4,35 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации - 0,817 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 158,0 нм - 84,6%, 95,3 нм - 10,2%, 34,3 - 5,2%. Таким образом, при использовании только 1 цикла при 500 атм образуются гетерогенные по размерам липосомы. Концентрация после стерилизующей фильтрации 0,756 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 92,53%. Объем стерильной эмульсии - 200 мл. Эмульсию разливают во флаконы, лиофилизируют и герметизируют в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 166,0 нм - 90,6%, 84,5 нм - 6,4%, 45,0 нм - 3,0% pH - 5,75. Включение после лиофилизации 88,5% доцетаксела. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Подытоживая, при использовании 1 цикла гомогенизации при 500 атм после лиофилизации сохранены наноразмеры, но были представлены гетерогенными по размеру липосомами. В данном примере обнаружено снижение включения доцетаксела в липосомы. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:21,5:36).

Пример 7.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4085 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с pH 5,66, в которой находилось 2,5 г лактозы (из необходимых 6,85 г) и 80,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,827 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,7%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего три цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 200 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (4,35 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации - 0,812 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 138,0 нм - 94,6%, 54,3 - 5,4%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,799 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 98,5%. Объем стерильной эмульсии - 202 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизовали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 146,0 нм - 92,6%, 54,5 нм - 7,4%; pH - 5,65. Включение не менее 96,5% доцетаксела. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:21,5:36).

Пример 8. Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 2280 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном

испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с pH 5,60, в которой находилось 5,0 г лактозы (из необходимых 11,97 г) и 75,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,817 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,6%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначально давление (всего два цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 200 нм. При достижении заданного размера частиц в эмульсию добавляли оставшийся стерильный раствор лактозы (6,97 г). Гомогенизацию проводили до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации 0,814 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 141,4 нм - 90,1%, 43,6 - 9,9%. Концентрация после стерилизующей фильтрации - 0,712 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 87,46%. Объем стерильной эмульсии 200 мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 153,0 нм - 90,6%, 68,5 нм - 9,4%; pH - 5,72. Включение не менее 96,5%. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:12:63). Как видно из данного примера уменьшение количества фосфатидилхолина приводило к снижению включения доцетаксела в липосомы.

Пример 9.

По способу прототипа [15]. 500 мг доцетаксела, 6 мг натрия олеата и 6 г L- α -фосфатидилхолина соли растворяли в хлороформе, концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин до полного удаления хлороформа.

Полученную массу диспергировали в 100 мл воды, используя магнитные мешалки 200 об/мин, в течение 10 мин при окружающей температуре. Диспергирование многослойных липосом проводили через Microfluidics при 15.000 psi. Проведено 3 цикла гомогенизации и получены липосомы размером 40-60 нм в диаметре. Трегалоза в виде порошка была добавлена к липосомам до конечной концентрации 10%. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм.

Фильтрация проходила медленно: 100 мл фильтровали не менее 15 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 178,4 нм - 90,1%, 56,23 - 9,9%. Концентрация после стерилизующей фильтрации 4,7 мг/мл. Количество примесей в доцетакселе 1,62%. Включение после стерилизующей фильтрации 94,0%. Объем стерильной эмульсии 96 мл. Эмульсию разливают во флаконы, лиофилизируют и герметизируют в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 160,0 нм - 94,6%, 48,5 нм - 5,4%; pH - 6,85. Включение не менее 92,5%. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало появление дополнительных примесей доцетаксела до 3,7%, что свидетельствует о нестабильности продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:криопротектор (1:12:20).

Пример 10.

Доцетаксел тригидрат в количестве 190 мг растворяли в 6,5 мл хлороформа, фосфатидилхолин яичного желтка в количестве 4085 мг растворяли в 100 мл хлороформа. Хлороформные растворы объединяли, фильтровали через мембраны 0,22 мкм и концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 42-45°C в течение 120 мин. Затем полученную липидную пленку обрабатывали газообразным азотом при перемешивании (60-80 об/мин) в течение 1 ч до полного удаления хлороформа.

К липидной пленке, содержащей фосфатидилхолин и доцетаксел, добавляли 230 мл буферной смеси с pH 5,66, в которой находилось 6,85 г лактозы (из необходимых 6,85 г) и 80,0 мг лимонной кислоты при температуре 40-43°C. Емкость с эмульсией перемешивали при 130-150 об/мин в течение 2 ч, поддерживая температуру 40-43°C. Контроль эмульсии: концентрация 0,827 мг/мл доцетаксела. Количество примесей на уровне исходной субстанции доцетаксела не превышало 1,65%.

Эмульсию переносили в гомогенизатор высокого давления и проводили гомогенизацию при температуре 38-43°C. Первоначальное давление (всего два цикла) 500 атм. Затем продолжали гомогенизацию при 800 атм до размера частиц не более 150 нм. Концентрация доцетаксела до стерилизующей фильтрации 0,812 мг/мл. Эмульсию фильтровали через каскад фильтров с финишным фильтром 0,2 мкм. Фильтрация проходила удовлетворительно: 230 мл фильтровали не более 10 мин. Размер частиц после стерилизующей фильтрации 138,0 нм - 94,6%, 54,3 - 5,4%. Концентрация после стерилизующей фильтрации 0,723 мг/мл. Включение после стерилизующей фильтрации - 89,0%. Объем стерильной эмульсии - 205

мл. Эмульсию разливали во флаконы, лиофилизировали и герметизировали в атмосфере инертного газа (азота). По результатам контроля продукта, полученного по предлагаемому способу, после лиофилизации установлено, что препарат представлен в виде легкой аморфной массы белого цвета с характерным запахом; размер частиц сохранен в нанодиапазоне - 136,0 нм - 93,%, 64,5 нм - 7,4%; pH - 5,65. Включение не менее 88,0% доцетаксела. Хранение препарата при температуре от 2 до 8°C в течение 6 месяцев продемонстрировало стабильность продукта. Соотношение компонентов в препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - (1:21,5:36). Как видно из данного примера, добавление криопротектора перед гомогенизацией приводило к снижению включения доцетаксела в липосомы.

Пример 11.

При исследовании фармакокинетики липосомального и нелипосомального доцетаксела при однократном инъекционном введении крысам наблюдалось его быстрое выведение из плазмы крови с максимальной концентрацией около 500-1500 нг/мл. Уровни концентраций в плазме липосомального и нелипосомального доцетаксела не различались.

Существенные различия наблюдались при определении доцетаксела в печени крыс. C_{max} для липосомальной формы составляла около 25 мкг/г (T_{max} - 0,25 ч), для нелипосомальной - около 70 мкг/г (T_{max} - 8 ч). Липосомальный доцетаксел практически полностью выводился из печени к 72 ч (76 нг/г), в отличие от нелипосомального, который сохраняется в печени к 72 ч после введения на уровне 56 мкг/г, причем наблюдается тенденция к его кумуляции. Фармакокинетические профили доцетаксела в печени крыс представлены на фиг. 1.

Наблюдались также различия для мозга - липосомальный доцетаксел практически не проникал через ГЭБ и обнаруживался в небольших дозах (до 1500 нг/г) не позднее 1,5 ч после введения. Нелипосомальный доцетаксел обнаруживался в мозге крыс даже спустя 72 ч после введения в диапазоне концентраций 530-2330 нг/г. Фармакокинетические профили доцетаксела в мозге крыс представлены на фиг. 2.

Схожие фармакокинетические профили наблюдались для почек (фиг. 3): для липосомального доцетаксела C_{max} составила около 38 мкг/г, для нелипосомального - 30 мкг/г (T_{max} - 0,25 ч в обоих случаях). При этом в отличие от нелипосомальной формы фармакокинетический профиль у липосомального доцетаксела в почках наблюдался второй максимум (около 15 мкг/г) спустя 24 ч после введения.

Аналогичная, как и для почек, наблюдалась картина для сердца (фиг. 4). Для липосомального доцетаксела C_{max} составила около 18 мкг/г, для нелипосомального - 11 мкг/г (T_{max} - 0,25 ч в обоих случаях). При этом в отличие от нелипосомальной формы фармакокинетический профиль у липосомального доцетаксела в почках наблюдался второй максимум (около 3,5 мкг/г) спустя 24 ч после введения.

Низкое проникновение липосомального доцетаксела в печень и мозг позволяет сделать вывод о его потенциально низкой гепатотоксичности и нейротоксичности.

Подытоживая, полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что продукт, полученный согласно заявленному способу - гомогенизация в два цикла: первоначально при 500 атм и последующая при 800 атм до указанного размера; использование для стабилизации доцетаксела лимонной кислоты (0,33-0,39 мг/мл); и соотношение компонентов в итоговом препарате: доцетаксел:фосфатидилхолин:лактоза - 1:18,0-25,0:22,0:63,0 (см. примеры 1-4), обеспечивают стабильность композиции липосом с включенным в них доцетакселом и обладают низкой гепатотоксичностью и нейротоксичностью. Воспроизведение заявленного способа при изменении параметров (см. примеры 5-9), а также способ согласно прототипу (пример 10) влечет трудности в реализации собственно способа и снижение качества целевого продукта, а именно

- увеличение размера и неоднородность дисперсионного состава липосом (пример 6);
- нестабильность доцетаксела в составе липосом, что сопровождается увеличением примесей (пример 5 и 10);
- уменьшение включения доцетаксела в липосомы и нестабильность размеров липосом (примеры 6, 8, 9, 10)
- существенное увеличение времени фильтрации липосомальной эмульсии (практически в 4 раза) (пример 10).

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было проведено изучение стабильности доцетаксела после лиофилизации образцов липосом по сравнению с исходной субстанцией. Подтверждена идентичность качественного и количественного состава доцетаксела после высушивания и последующей регидратации образцов липосом. Содержание примесей и время их удерживания не изменились, что может свидетельствовать о стабильности доцетаксела в процессе получения липосом и их последующего сублимационного высушивания.

Таким образом, использование наночастиц, представляющих собой искусственные мембраны - липосомы, нагруженные гидрофобным цитостатиком доцетакселом, представляют несомненный интерес для дальнейшего изучения. Кроме того, введение в практику препарата, имеющего двойное действие - противоопухолевое и мембранопротекторное, позволяет улучшить качество лечения за счет снижения токсических проявлений.

Список литературы.

1. Григорьева А.С., Конахович Н.Ф., Стефанов А.В., Краснопольский Ю.М., Темиров Ю.П. Спосіб отримання ліпосомального гепатопротекторного засобу. Патент України № 46528 (2003_).
2. Дудниченко О.С., Темиров Ю.П., Швець В.И., Краснопольский Ю.М. Спосіб одержання ліпосомальної форми протипухлинного антибіотика. Патент України №64591 (2005).
3. Дурр М., Хагер И.К., Вензель А. Фармацевтическая композиция на основе таксоидов и способ её получения. Патент РФ № 2157200 (2000).
4. Зырянов С.К., Белоусов Ю.Б. Генерики в онкологии: сравнительный анализ воспроизведенных препаратов доцетаксела. Фарматека. 2008. № 18. С. 56-59.
5. Ковтун Т.А., Гаевой К.В., Севидов В.В. Длительная инфузия доцетаксела (Таксотера) в полихимиотерапии 2-й линии у больных с прогрессирующими солидными опухолями. Онкология. 2006. 8. № 3. С. 285-286.
6. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швець В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. Биофармацевтический журнал. 2009. 1. № 3. С. 18-29.
7. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швець В.И. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта фармацевтических субстанций. Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3. № 2. С. 10-18.
8. Кулик Г.И., Пономарева О.В., Король В.И., Чехун В.Ф. Токсичность и противоопухолевая активность липосомальной лекарственной формы доксорубина. Онкология. 2004. 6. № 3. С. 1-4.
9. Кулик Г.И., Пивнюк В.М., Носко М.М., Тодор И.Н., Чехун В.Ф. Липосомальные препараты: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину. Онкология. 2009. 11. № 1. С. 76-80.

10. Півнюк В.М. Використання ліпосомальних форм хіміопрепаратів у хворих на резистентний до доксорубіцину рак молочної залози / В.М. Півнюк, Ю.О. Тимовська, О.В. Пономарева, Г.І. Кулик, Г.П. Олейніченко, М.Ф. Анікусько, Ю. М. Краснопольський, В.Ф. Чехун- Онкологія. 2007. Т.9. № 2. - С. 120-124.
11. Стенина М. Таксотер (доцетаксел) в адьювантної терапії рака молочної залози. Врач. 2008. № 5. С. 1-4.
12. Стефанов О.В., Григорьева Г.С., Соловьев А.И., Пасечникова Н.В., Хромов А.С., Конахович Н.Ф., Краснопольський Ю.М. Спосіб отримання ліпосомального засобу, що містить кверцетин. Патент України № 76393 (2006).
13. Теміров Ю.П., Швець В.І., Краснопольський Ю.М., Сеннікова І.Г. Спосіб отримання ліпосомального антибактеріального засобу хлорофиллипту. Патент України № 69303 (2006).
14. Hanna N., Shepherd F.A., Fossella F.V. et al. Randomized Phase III Trial of Pemetrexed Versus Docetaxel in Patients with Non-small-cell Lung Cancer Previously Treated with Chemotherapy. J. of clinical Oncology. 2004. 22. №. 10. P. 1589-1597.
15. Indu Javeri, Kaliappanador Nelliappon. Methods for the preparation of Liposomes comprising Docetaxel. Номер публикации: 20110070293 Дата публикации 2011-03-24.- Прототип
16. Mescheder A., Karrasch M. Method of administering a cationic liposomal preparation comprising paclitaxel // WO 2006 -117220.

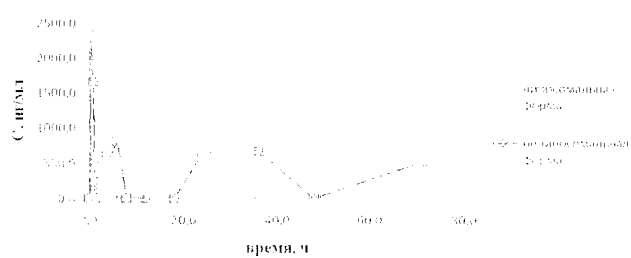
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения липосомального противоопухолевого препарата, включающий смешивание растворов фосфатидилхолина и доцетаксела в хлороформе, высушивание смеси, ее эмульгирование в водной среде, диспергирование эмульсии, гомогенизацию, добавление криопротектора, стерилизующую фильтрацию и лиофильное высушивание, отличающийся тем, что эмульгирование проводят в водной среде, содержащей лимонную кислоту в концентрации (0,33-0,39 мг/мл), гомогенизацию проводят по меньшей мере в два этапа: первоначальный при 500 атм, последующий при 800 атм, добавление криопротектора - лактозы проводят дробно: первоначально при эмульгировании, а затем в процессе гомогенизации, при этом массовое соотношение компонентов в полученном препарате доцетаксел:фосфатидилхолин:криопротектор находится в пределах 1:(18,0-25,0):(22-63) соответственно.



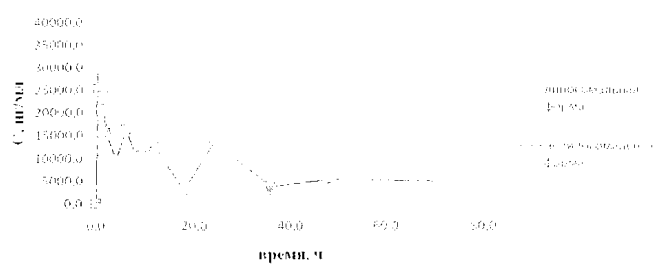
Фиг. 1

Фармакокинетические профили доцетаксела в мозге крыс



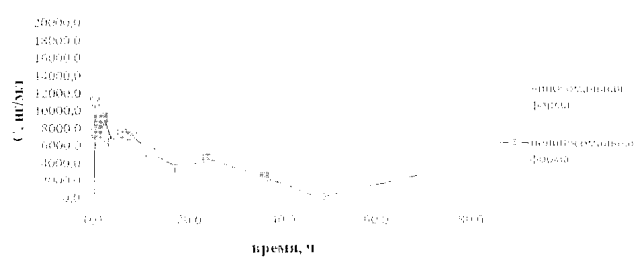
Фиг. 2

Фармакокинетические профили доцетаксела в почках крыс



Фиг. 3

Фармакокинетические профили доцетаксела в сердце крыс



Фиг. 4

