РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 423 104** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 9/08 (2006.01)
A61J 1/06 (2006.01)
B65D 1/09 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008140367/15, 13.03.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.03.2007

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
24.03.2006 DE 102006013531.8

(43) Дата публикации заявки: **20.04.2010** Бюл. № 11

(45) Опубликовано: **10.07.2011** Бюл. № **19**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **L.MU et al: "Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system" COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES, ELSEVIER, Amsterdam Bd. 47, №.1, p.90-97, 15.01.2006. US 6117454 A, 12.09.2000. Промышленная технология лекарств. / Под ред.проф. В.И.Чуешова. - Харьков, 2002, т.1, гл.9.3.2 «Фильтрование», гл.9.3.3 «Центрифугирование».**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **13.10.2008**

(86) Заявка PCT:
EP 2007/002198 (13.03.2007)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2007/110152 (04.10.2007)

Адрес для переписки:
119296, Москва, а/я 113, пат.пов. Э.П.Песикову, рег.№ 204

(72) Автор(ы):
КРОЙТЕР Йорг (DE),
ГЕЛПЕРИНА Светлана (RU),
МАКСИМЕНКО Ольга (RU),
ХАЛАНСКИЙ Александр (RU)

(73) Патентообладатель(и):
ЛТС ЛОМАНН ТЕРАПИ-ЗЮСТЕМЕ АГ (DE)

(54) ПОЛИЛАКТИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармацевтической промышленности, в частности к способу получения системы направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер. Система содержит наночастицы на основе поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида), фармакологически активное вещество, абсорбируемое, адсорбируемое и/или включаемое в наночастицы, и содержит TPGS или имеет покрытие из поверхностно-активного вещества плуроник 188, которое осаждают на наполненные лекарством

RU 2423104 C2

RU 2423104 C2

наночастицы. Описаны способы получения системы направленной доставки лекарства и применение системы направленной доставки лекарства для лечения заболевания или расстройства ЦНС. 9 н. и 11 з.п. ф-лы, 2 ил.

RU 2423104 C2

RU 2423104 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 423 104** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 9/08 (2006.01)
A61J 1/06 (2006.01)
B65D 1/09 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2008140367/15, 13.03.2007**

(24) Effective date for property rights:
13.03.2007

Priority:
(30) Priority:
24.03.2006 DE 102006013531.8

(43) Application published: **20.04.2010** Bull. 11

(45) Date of publication: **10.07.2011 Bull. 19**

(85) Commencement of national phase: **13.10.2008**

(86) PCT application:
EP 2007/002198 (13.03.2007)

(87) PCT publication:
WO 2007/110152 (04.10.2007)

Mail address:
119296, Moskva, a/ja 113, pat.pov. Eh.P.Pesikovu, reg.№ 204

(72) Inventor(s):
KROJTER Jorg (DE),
GELPERINA Svetlana (RU),
MAKSIMENKO Ol'ga (RU),
KhALANSKIJ Aleksandr (RU)

(73) Proprietor(s):
LTS LOMANN TERAPI-ZJuSTEME AG (DE)

RU 2423104 C2

(54) POLYLACTIDE NANOPARTICLES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention relates to field of pharmaceutical industry, in particular to method of obtaining system of targeted drug delivery for introduction of pharmaceutically active substance into central nervous system of mammals through hematoencephalic barrier. System contains poly(DL-lactide) and/or poly(DL-lactide-soglycolide)-based nanoparticles, pharmacologically active substance, absorbed, adsorbed and/or included into nanoparticles, and contains TPGS or has coating from surface-active substance pluronic 188, which is precipitated on drug-filled nanoparticles. Described are methods of obtaining system of targeted drug delivery and application of system of targeted drug delivery for treatment of CNS disease or disorder.

EFFECT: elaboration of efficient method of obtaining system of targeted drug delivery for introduction of pharmacologically active substance into central nervous system of mammals through hematoencephalic barrier.

20 cl, 14 ex, 2 dwg

RU 2423104 C2

Настоящее изобретение относится к системам направленной доставки фармакологических активных веществ к центральной нервной системе млекопитающих. В частности, настоящее изобретение относится к системам направленной доставки лекарств в виде наночастиц, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер млекопитающих. Более точно, настоящее изобретение относится к наполненным лекарством наночастицам на основе полиактидов и/или полиактид-согликолидов, способам получения наполненных лекарством наночастиц на основе полиактидов и/или полиактид-согликолидов и применению наполненных лекарством наночастиц на основе полиактидов и/или полиактид-согликолидов для лечения заболеваний или расстройств центральной нервной системы, в частности лечения нейронного рака.

Для лечения заболеваний или расстройств центральной нервной системы (ЦНС) могут применяться лекарства, действующие на функцию нервной системы. Эти лекарства обычно вводят нуждающемуся в них пациенту обычным пероральным путем и путем инъекции. К сожалению, многие лекарства, такие как аденозин, β-эндорфин, синтетические аналоги эндогенных пептидов, моторных и тормозных аминокислот и трофических факторов вообще не способны преодолеть гематоэнцефалический барьер или преодолевают его в недостаточной степени для обеспечения терапевтического эффекта. Такие лекарства терапевтически эффективны только при введении непосредственно в мозг, например путем прямого введения в ЦНС.

В качестве альтернативы прямому введению в ЦНС в патенте US 6117454 предложен способ переноса лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер млекопитающих, в котором для направленной доставки лекарств или диагностических средств к ЦНС путем преодоления гематоэнцефалического барьера используют наночастицы. Согласно патенту US 6117454 во время или после полимеризации соответствующих мономеров, таких как цианакрилат добавляют лекарство, которое включают в получаемые полибутилцианакрилатные наночастицы или адсорбируют на их поверхность. Как полагают, эти комплексы наночастиц и лекарства способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и направленно доставлять лекарства к ЦНС, если они покрыты соответствующим поверхностно-активным веществом. Полиоксиэтилен 20 сорбитанмонолаурат (Tween® 20), полиоксиэтилен 20 сорбитанмонопальмитат (Tween® 40), полиоксиэтилен 20 сорбитанмоностеарат (Tween® 60), полиоксиэтилен 20 сорбитанмоноолеат (Tween® 80) и их смеси заявлены в качестве соответствующих поверхностно-активных веществ, позволяющих наполненным лекарством полибутилцианакрилатным наночастицам пересекать гематоэнцефалический барьер.

В данном патенте указано, что в целом любое лекарство может быть включено в покрытые поверхностно-активным веществом наночастицы или связано с ними и доставлено к головному мозгу без необходимости изменения структуры лекарства. Таким образом, в US 6117454 предложен первый универсальный способ направленной доставки лекарства к ЦНС путем преодоления гематоэнцефалического барьера.

Обеспокоенность вероятностью токсичных побочных эффектов поверхностно-активных веществ, используемых для покрытия получаемых полибутилцианакрилатных наночастиц, и желание упростить процесс получения наполненных лекарством наночастиц привели к созданию упрощенного и потенциально менее токсичного способа получения наночастиц, описанного в заявке WO 98/56361.

Согласно идее WO 98/56361 поверхностно-активные вещества не требуются, если наночастицы получают с использованием декстрана 12.000 или полисорбата 85 (полиоксиэтилен 20 сорбитантриолеата; Tween® 85) в качестве стабилизаторов во время полимеризации мономеров бутилцианакрилата. Было доказано, что даларгин, адсорбируемый на стабилизированные полибутилцианакрилатные наночастицы, способен преодолевать гематоэнцефалический барьер, а амитриптилин, адсорбируемый на стабилизированные полисорбатом 85 наночастицы, накапливается в головном мозге в более высоких концентрациях, чем амитриптилин как таковой.

Тем не менее, по-прежнему существует потребность в альтернативных системах наполненных лекарством наночастиц для направленной доставки лекарств к ЦНС млекопитающих через гематоэнцефалический барьер с целью улучшения одного или нескольких из следующих показателей, включающих эффективность, специфичность, токсичность или простоту получения.

В связи с этим в основу настоящего изобретения положена задача создания усовершенствованной системы направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающего через его гематоэнцефалический барьер.

Эта задача решена с помощью система направленной доставки лекарства, содержащей наночастицы на основе поли(DL-лактида) (PLA) и/или поли(DL-лактид-согликолида) (PLGA), в которой фармакологически активное вещество абсорбируют, адсорбируют и/или включают в наночастицы, а наночастицы содержат TPGS или имеют покрытие из поверхностно-активного вещества полоксамер 188, которое осаждают на наполненные лекарством наночастицы.

Подразумевается, что используемый в описании термин "наполненные лекарством наночастицы" относится к наночастицам, содержащим фармакологически активное вещество. Фармакологически активным веществом может являться терапевтическое средство или диагностическое средство. Следовательно, "наполненные лекарством наночастицы" согласно изобретению содержат по меньшей мере одно терапевтическое средство и/или по меньшей мере одно диагностическое средство, абсорбируемое, адсорбируемое или включаемое в упомянутые наночастицы.

Используемый в описании термин "гематоэнцефалический барьер" относится к гематоэнцефалическому барьеру как таковому, т.е. эндотелию сосудов головного мозга, базальной мембране и глиальным клеткам. Гематоэнцефалический барьер служит для регулирования поступления веществ в головной мозг. Используемый в описании термин "гематоэнцефалический барьер" также относится к гематоспинномозговому барьеру и гематоретинальному барьеру.

Полилактиды (PLA), также называемые полимолочными кислотами, являются сложными полиэфирами на основе молочной кислоты. Полилактиды являются полиоксикислотами. Они являются биологически совместимыми и поддающимися биологическому разложению.

Свойства полилактидов главным образом зависят от их молекулярной массы, степени кристаллизации и доли сополимеров, если это применимо. С увеличением молекулярной массы полилактидов повышается температура их перехода в стеклообразное состояние, температура плавления, прочность при растяжении и модуль упругости, но уменьшается относительное удлинение при разрыве.

Полилактиды могут быть получены методом полимеризации лактида с раскрытием цикла. Полимеризацию с раскрытием цикла осуществляют при температуре от 140 до 180°C в присутствии катализатора на основе октоата олова. Этим способом можно

легко получить Полилактиды с высокой молекулярной массой.

Кроме того, высокомолекулярные и чистые полилактиды можно получать непосредственно из молочной кислоты путем так называемой поликонденсации.

Полилактидсогликолиды (PLGA) являются поддающимися биологическому разложению полимерами, которые состоят из молочной кислоты, связанной с гликолевой кислотой, соответствующие процентные концентрации которых оказывают основное влияние на скорость высвобождения лекарства. Соотношение лактида и гликолида может составлять от 90:10 до 10:90, предпочтительно от 20:80 до 80:20, более предпочтительно от 40:60 до 60:40 и наиболее предпочтительно 50:50. Лактид является оптически активным, при этом изомеры D и L могут присутствовать в любых пропорциях, начиная с соотношения чистый D-лактид : чистый L-лактид, при этом содержание рацематов составляет 50% D-лактида и 50% L-лактида.

Полоксамеры являются неионными блок-сополимерами полиоксиэтилена и полиоксипропилена с общей формулой $HO(C_2H_4O)_a(-C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$. Существуют их различные виды, от жидких до твердых. Полоксамеры используют в качестве эмульгаторов, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ и увлажняющих средств для антибиотиков.

Полоксамер 188 (Pluronic® F68 (BASF Corp.)) является дифункциональным блок-сополимерным поверхностно-активным веществом с концевыми основными гидроксильными группами. Он представляет собой неионное, относительно нетоксичное поверхностно-активное вещество. Полоксамер 188 имеет среднюю молекулярную массу 8400, вязкость 1000 сПз при 77°C, точку помутнения (при водосодержании 10%)>100°C и показатель гидрофильно-липофильного баланса>24.

Полоксамер 185 (Pluronic® P65 (BASF Corp.)) является дифункциональным блок-сополимерным поверхностно-активным веществом с концевыми основными гидроксильными группами. Он представляет собой неионное, относительно нетоксичное поверхностно-активное вещество. Pluronic® P65 имеет среднюю молекулярную массу 3400, вязкость 180 сПз при 60°C, точку помутнения (при водосодержании 10%) 80-84°C и показатель гидрофильно-липофильного баланса 12-18.

Pluronic® P85 (BASF Corp.), также именуемый полоксамером 235, является дифункциональным блок-сополимерным поверхностно-активным веществом с концевыми основными гидроксильными группами. Он представляет собой неионное, относительно нетоксичное поверхностно-активное вещество. Pluronic® P85 имеет среднюю молекулярную массу 4600, вязкость 310 сПз при 60°C, точку помутнения (при водосодержании 10%) 83-89°C и показатель гидрофильно-липофильного баланса 12-18.

Полисорбат 80 (полиоксиэтилен-сорбитан-моноолеат, Tween® 80) является неионным поверхностно-активным веществом. Полисорбат 80 имеет среднюю молекулярную массу 1300, вязкость 375-480 мПа·с при 25°C и показатель гидрофильно-липофильного баланса 14-16.

TPGS (D-α-токоферолполиэтиленгликоль 1000 сукцинат) является растворимым в воде производным d-α-токоферолсукцината. TPGS применяют в качестве растворимой в воде формы витамина E для лиц, страдающих синдромами нарушенной абсорбции жира, такими как детский хронический холестаз. Его также применяют в качестве усилителя абсорбции и биологической доступности ампренавира, являющегося нерастворимым в воде ингибитором протеазы ВИЧ, и растворимых в жирах витаминов, таких как витамин D. TPGS синтезируют путем эстерификации d-α-токоферолсукцината полиэтиленгликолем (ПЭГ) 1000 (молекулярная масса ПЭГ 1000

составляет примерно 1000 дальтон). Его молекулярная масса составляет 1513 дальтон. Это бледно-желтое воскообразное твердое амфипатическое и гидрофильное вещество. Фармакокинетика TPGS еще выясняется. После приема внутрь TPGS более эффективно абсорбируется из просвета тонкой кишки, чем другие формы витамина Е. Механизм его всасывания в кишечные клетки остается неясным. С учетом своей амфипатической природы (наличия как гидрофильных, так и липофильных окончаний) TPGS образует собственные мицеллы, и для этого не требуются соли желчных кислот. TPGS способен усиливать абсорбцию липофильных лекарств, если он входит в состав этих лекарств. Кроме того, повышение пероральной биологической доступности некоторых лекарств при их одновременном введении с TPGS может частично происходить вследствие ингибирования Р-гликопротеина в кишечнике.

Наполненные лекарством наночастицы на основе PLA и наночастицы на основе PLGA согласно изобретению могут использоваться для направленной доставки лекарства через гематоэнцефалический барьер к центральной нервной системе и для лечения заболеваний или расстройств центральной нервной системы или изготовления лекарственного средства для лечения заболеваний или расстройств центральной нервной системы.

На фиг.1 показана диаграмма, иллюстрирующая выживаемость крыс с внутричерепной 101/8 глиобластомой после химиотерапии различными препаратами наночастиц, содержащими доксорубицин.

На фиг.2 показана диаграмма, иллюстрирующая выживаемость крыс с внутричерепной глиобластомой 101/8 после химиотерапии различными препаратами наночастиц, содержащими доксорубицин и TPGS.

Наполненные лекарством наночастицы на основе PLA и наночастицы на основе PLGA согласно изобретению могут быть получены a) методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя или b) методом двойной эмульсии (водомасляной эмульсии в воде).

Метод гомогенизации под высоким давлением испарения растворителя

Обычно полимер и лекарство растворяют в органическом растворителе. Эту органическую фазу медленно вливают в водный раствор стабилизатора с одновременным помешиванием. Затем смесь эмульгируют с использованием высокоскоростного гомогенизатора сдвигового типа. Затем полученную первичную эмульсию под высоким давлением пропускают через гомогенизатор высокого давления. Органический растворитель удаляют путем медленного испарения при комнатной температуре и нормальном давлении с одновременным помешиванием или путем быстрого испарения при пониженном давлении. При этом происходит затвердевание нанокапель в водной системе.

Полученную наносуспензию фильтруют через фильтр из пористого стекла. Для хранения добавляют криозащитный агент, предпочтительно 5 мас./об.% маннитола. Затем суспензию разливают по пробиркам, замораживают при температуре -35°С и впоследствии подвергают сублимационной сушке.

Если при получении системы направленной доставки лекарства в качестве эмульгаторов и/или противоионов необходимо использовать дополнительные соединения, такие как цетилфосфат, холестериловый сульфат калия или токоферолсукцинат, полимер и липидное соединение делают растворимыми в органическом растворителе и растворяют лекарство в воде. Органический и водный растворы смешивают и выдерживают при комнатной температуре. Затем смесь вливают в перемешиваемый водный раствор, содержащий стабилизатор, после чего

подвергают дальнейшей обработке, как это описано выше.

Метод двойной эмульсии

Обычно полимер растворяют в органическом растворителе, а лекарство растворяют в воде. К органической фазе добавляют водный раствор. Смесь эмульгируют. Полученную водомасляную эмульсию добавляют к водному раствору стабилизатора и затем дополнительно эмульгируют. Полученную грубую эмульсию пропускают через гомогенизатор высокого давления. Чтобы получить стабильную водомасляную эмульсию в воде, стадию гомогенизации повторяют несколько раз. Затем органический растворитель удаляют путем медленного испарения при комнатной температуре и нормальном давлении.

Перед добавлением раствора к органической фазе лекарство и дополнительный эмульгатор, такой как γ-циклодекстрин, необязательно растворяют в воде.

Полученную наносуспензию фильтруют через фильтр из пористого стекла. Для хранения добавляют криозащитный агент и разливают наносуспензию по пробиркам, замораживают и впоследствии подвергают сублимационной сушке.

Полученные составы на основе наночастиц необходимо испытать на возможность повторного получения суспензии, определить их гранулометрический состав, наполнение лекарством (теоретическое) и содержание лекарства.

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

Предложенная в изобретении система направленной доставки лекарства содержит наночастицы на основе поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида), одно фармакологически активное вещество, а также содержит TPGS или имеет покрытие из поверхностно-активного вещества, осажденное на наполненные лекарством наночастицы, при этом поверхностно-активным веществом является полоксамер 188.

В одном из вариантов осуществления наночастицы системы направленной доставки лекарства имеют диаметр менее 1000 нм, предпочтительно от 100 до 800 нм, наиболее предпочтительно от 130 до 160 нм.

Наночастицы на основе PLA и/или PLGA согласно настоящему изобретению могут быть наполнены практически любым фармакологически активным веществом с целью введения упомянутого фармакологически активного вещества, т.е. терапевтического средства или диагностического средства в ЦНС млекопитающих через гематоэнцефалический барьер.

Терапевтическое средство может быть выбрано из группы, включающей лекарства, действующие на синаптические и нейроэффекторные соединительные участки; обезболивающие и анестезирующие средства общего и местного действия; снотворные средства и седативные средства; лекарства для лечения психиатрических расстройств, таких как депрессия и шизофрения; антиэпилептические средства и противосудорожные средства; лекарства для лечения болезни Гентингтона, старения и Болезни Альцгеймера; антагонисты и нейротропные факторы моторных аминокислотных рецепторов и нейрорегенеративные средства; трофические факторы; лекарства для лечения повреждения ЦНС или нарушения мозгового кровообращения; лекарства для лечения привыкания и злоупотребления лекарственными средствами; физиологически активные вещества и противовоспалительные лекарства;

хемиотерапевтические средства против паразитарных инфекций и микробных заболеваний; иммунодепрессивные средства и противораковые лекарства; гормоны и антагонисты гормонов; тяжелые металлы и антагонисты тяжелых металлов; антагонисты неметаллических токсичных веществ; цитостатики для лечения рака; диагностические вещества для применения в медицинской радиологии; иммуноактивные и иммунореактивные средства; медиаторы и их соответствующие агонисты и антагонисты рецепторов, их соответствующие предшественники или метаболиты; антибиотики, антиспазматические средства, антигистаминные средства, средства против рвоты, релаксанты, стимуляторы, "смысловые" и "антисмысловые" олигонуклеотиды, средства для расширения сосудов головного мозга, психотропные средства, противоманиакальные средства, сосудорасширяющие и сосудосуживающие средства, антигипертензивные средства, средства против мигрени, снотворные средства, гипер- или гипогликемические средства, минеральные или питательные добавки, лекарства против ожирения, анаболические средства и противоастматические средства и их смеси.

Предпочтительными терапевтическими средствами являются противораковые лекарства, предпочтительно противоопухолевые средства. Противоопухолевые средства могут быть выбраны из группы, включающей алкалоиды, алкилирующие средства, такие как алкилсульфонаты, азиридины, этиленимины и метилмеламины, азотистые иприты, нитрозомочевины, антибиотики и аналоги, предпочтительно антрациклины, антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пурина и аналоги пиримидина, ферменты, иммуномодулирующие средства, иммунотоксины, моноклональные антитела и комплексы платины.

Особо предпочтительное противоопухолевое средство может быть выбрано из группы, включающей 9-аминокамптотецин, доцетаксел, эктеинаспидины, этопозид, иринотекан, паклитаксел, рубитекан, тенипозид, топотекан, винбластин, винкристин, виндезин, бусульфан, импросульфан, пипосульфан, карбокуон, уредепа, альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид, хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, хлористоводородный мехлорэтаминоксид, мелфалан, новэмбихин, перфосфамид, фенестерин, преднимустин, трихлорметин, трофосфамид, урациловый иприт, кармустин, хлорзотоцин, фотэмустин, ломустин, нимустин, ранимустин, дакарбазин, манномустин, митобронитол, митолактол, пипоброман, темозоломид, аклациномицины, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карубицин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, 6-диазо-5-оксо-Lнорлейцин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, меногарил, митомицины, микофенольная кислота, ногаламицин, оливомицины, пеплеомицин, пирарубицин, пликамицин, порфиромицин, пуромицин, стрептонигрин, стрептозоцин, TNP-470, туберцидин, вальрубицин, зиностатин, зорубицин, деноптерин, эдатрексат, метотрексат, нолатрексед, пеметрексед, пиритрексим, птероптерин, ралитрексед, триметрексат, кладрибин, флударабин, бмеркаптопурин, тиампирин, тиогуанин, тиазофурин, антитабин, азацитидин, 6-азауридин, капецитабин, кармофур, цитарабин, децитабин, доксифлуридин, эмитефур, эноцитабин, флоксуридин, фторурацил, гемцитабин, тегафур, Lаспарагиназу, ранпирназу, бропиримин, α-интерферон, γ-интерферон, интерлейкин-2, лентинан, пропагерманиум, PSK®, рокинимекс, сизофиран, убенимекс, денилейкиндифтитокс, алемтузумаб, эдреколомаб, гемтузумабозогамицин, ибритумомабтиуксетан, ритуксимаб, тоситумомаб^{131}I, трастузамаб, карбоплатин,

цисплатин, лобаплатин, мибоплатин, оксалиплатин, амсакрин, триоксид мышьяка, бисантрен, дефосфамин, демеколцин, диазикуон, эфлорнитрин, ацетат эллиптиния, этоглуцид, фенретинид, флавопиридол, нитрат галлия, гидроксимочевина, иматиниб, лиарозол, лонидамин, милтефозин, митогуазон, митоксантрон, мопидамол, нитракрин, пентостатин, фенамет, 2-этилгидразид подофиллиновой кислоты, прокарбазин, разоксан, собузоксан, спирогерманий, тенуазоновую кислоту, тирапазамин, тиразикуон и уретан.

Система направленной доставки лекарства согласно изобретению может быть получена методом гомогенизации под высоким давлением испарения растворителя или методом двойной эмульсии.

Предпочтительный способ получения системы направленной доставки лекарства, содержащей наночастицы на основе поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида), которые содержат TPGS, включает стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид), по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество и необязательно липидное соединение в органическом растворителе с целью получения органической фазы,

вливают органическую фазу в водный раствор, содержащий TPGS,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

гомогенизируют первичную эмульсию,

удаляют органический растворитель из первичной эмульсии и

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы.

Другой предпочтительный способ получения системы направленной доставки лекарства, содержащей наночастицы на основе поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида), которые содержат TPGS, включает стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид) в органическом растворителе с целью получения органической фазы,

растворяют, по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество в водном растворе,

вливают водный раствор в органическую фазу,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

вливают первичную эмульсию в водный раствор TPGS,

гомогенизируют смесь первичной эмульсии и водного раствора TPGS,

удаляют органический растворитель из смеси первичной эмульсии и водного раствора стабилизатора,

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы.

Предпочтительный способ получения системы направленной доставки лекарства, содержащей наполненные лекарством наночастицы на основе PLA и/или PLGA, покрытые полоксамером 188, включает стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид), по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество и необязательно липидное соединение в органическом растворителе с целью получения органической фазы,

вливают органическую фазу в водный раствор, необязательно содержащий стабилизатор,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

гомогенизируют первичную эмульсию,

удаляют органический растворитель из первичной эмульсии,

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы, и

покрывают наночастицы полоксамером 188.

Другой предпочтительный способ получения системы направленной доставки лекарства, содержащей наполненные лекарством наночастицы на основе PLA и/или PLGA, покрытые полоксамером 188, включает стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид) в органическом растворителе с целью получения органической фазы,

растворяют, по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество в водном растворе,

вливают водный раствор в органическую фазу,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

вливают первичную эмульсию в водный раствор стабилизатора,

гомогенизируют смесь первичной эмульсии и водного раствора стабилизатора,

удаляют органический растворитель из смеси первичной эмульсии и водного раствора стабилизатора,

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы, и

покрывают наночастицы полоксамером 188.

Предпочтительные диагностические терапевтические средства, в частности, противоопухолевые средства для получения системы направленной доставки лекарства согласно изобретению, перечислены выше.

Предпочтительные органические растворители для получения системы направленной доставки лекарства согласно изобретению выбирают из группы, включающей дихлорметан и хлороформ. В качестве растворителя для получения наночастиц на основе PLA и/или PLGA также может использоваться этилацетат при условии, что необязательный стабилизатор растворим в этилацетате.

Также дополнительно могут использоваться смеси дихлорметана и этилацетата.

Предпочтительное липидное соединение выбирают из группы, включающей цетилфосфат, холестериловый сульфат калия или токоферолсукцинат.

Предпочтительными стабилизаторами являются эмульгаторы, поверхностно-активные вещества или противоионы. Предпочтительные стабилизаторы выбирают из группы, включающей поливиниловые спирты, сывороточные альбумины, γ-циклодекстрин и токоферолполиэтиленгликоль 1000 сукцинат (TPGS), при этом поливиниловые спирты предпочтительно имеют молекулярную массу 30-70 килодальтон, а особо предпочтительным сывороточным альбумином является человеческий сывороточный альбумин.

С целью хранения получаемая наносуспензия наполненных лекарством наночастиц может быть подвергнута сублимационной сушке до нанесения покрытия из полоксамера 188. Предпочтительно до сублимационной сушки в наносуспензию добавляют криозащитный агент. Применимым криозащитным агентом является маннитол, который предпочтительно вводят в наносуспензию в количестве 5 мас./об.%.

Наполненные лекарством наночастицы покрывают раствором полоксамера 188 предпочтительно в растворе и предусматривают достаточное время, чтобы поверхностно-активное вещество покрыло наполненные лекарством наночастицы.

Система направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через

гематоэнцефалический барьер, содержащая наночастицы поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида), терапевтическое средство и TPGS или покрытие из поверхностно-активного вещества полоксамер 188, осажденное на наполненные лекарством наночастицы, может применяться для лечения заболеваний и расстройств центральной нервной системы млекопитающих. Система направленной доставки лекарства особо применима для введения фармакологически активных веществ, обладающих действием на центральную нервную систему, но не способных преодолевать гематоэнцефалический барьер млекопитающих, без их модификации или связывания с носителем.

Система направленной доставки лекарства согласно изобретению особо применима для лечения нейронных раков, поскольку она способна переносить противоопухолевые средства через гематоэнцефалический барьер и направленно доставлять эти противораковые лекарства к ЦНС.

Систему направленной доставки лекарства согласно изобретению вводят таким образом, чтобы она могла попасть в кровоток, за счет чего лекарство достигает гематоэнцефалического барьера и преодолевает его. Предпочтительно систему направленной доставки лекарства согласно изобретению вводят перорально или путем инъекции, наиболее предпочтительно путем внутривенной инъекции.

Примеры

1. Получение составов из наночастиц

У компании Absorbable Polymers (США) были приобретены различные сорта полимера Lactel®, включавшие поли(DL-лактид) (PLA) и поли(DL-лактид-согликолид) (PLGA); компания Sicor (Po, Италия) любезно предоставила гидрохлорид доксорубицина; у компании Sigma были приобретены цетилфосфат, холестериловый сульфат калия, поливиниловый спирт (ПВС) (молекулярная масса 30-70 килодальтон) и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА); D-α-токоферолполиэтиленгликоль 1000 сукцинат (TPGS) был приобретен у компании Eastman Chemical Company (США).

Наполненные лекарством наночастицы на основе PLA и наночастицы на основе PLGA получили методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя или методом двойной эмульсии.

При получении методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя полимер и лекарство обычно растворяли в дихлорметане. Эту органическую фазу медленно вливали с одновременным помешиванием в водный раствор стабилизатора (ПВС или ЧСА). Смесь эмульгировали с использованием высокоскоростного гомогенизатора сдвигового типа (Ultra-Turrax T-25 (IKA)). Затем полученную первичную эмульсию пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40; Gaulin GmbH, Germany) под давлением 400 бар. Органический растворитель удалили путем медленного испарения при комнатной температуре и нормальном давлении с одновременным помешиванием (в течение 3 часов) или путем быстрого испарения при пониженном давлении (в роторном испарителе BUCHI R-200). При этом происходило затвердевание нанокапель в водной системе. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и добавили 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Затем наносуспензию разлили по пробиркам, заморозили при температуре -35°C и подвергли сублимационной сушке.

В качестве эмульгаторов и/или противоионов в некоторых препаратах использовали липидные соединения, такие как цетилфосфат, холестериловый сульфат

калия или токоферолсукцинат.В этом случае полимер и липидный компонент сделали растворимыми в органическом растворителе (дихлорметане или хлороформе) и растворили лекарство в воде. Органический и водный растворы смешали и выдерживали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем смесь влили в перемешиваемый водный раствор (25 мл), содержавший стабилизатор, после чего подвергли дальнейшей обработке, как это описано выше.

При получении методом двойной эмульсии полимер (500 мг) обычно растворяли в дихлорметане (5 мл) (в течение 1 часа с магнитным перемешиванием). Лекарство (50 мг) растворили в воде (2 мл). Водный раствор по каплям добавили в органическую фазу. Смесь эмульгировали с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19 500 об/мин). Полученную водомасляную эмульсию добавили в 25 мл 1% водного раствора стабилизатора (ПВС, HAS или TGPS) и затем эмульгировали с использованием Ultra-Turrax T-25. Затем полученную грубую эмульсию пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) под давлением 600 бар. Стадию гомогенизации повторили несколько раз с целью получения стабильных водомасляных эмульсий в воде. Органический растворитель удалили из водомасляной эмульсии в воде путем медленного испарения при комнатной температуре и нормальном давлении (в магнитном перемешивающем устройстве в течение 3 часов). Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и добавили 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Затем эмульсию разлили по пробиркам, заморозили при температуре -35°C и подвергли сублимационной сушке.

Стандартным растворителем, используемым при получении наночастиц на основе PLA/ PLGA, является дихлорметан. Тем не менее, также может использоваться этилацетат или смеси дихлорметана и этилацетата. Однако некоторые противоионы не растворимы в этилацетате. В этих случаях этилацетат неприемлем в качестве растворителя для получения наночастиц на основе PLA/PLGA.

Полученные составы испытали на возможность повторного получения суспензии, гранулометрический состав, наполнение лекарством (теоретическое) и содержание лекарства.

Полученный состав на основе наночастиц считался применимым, если после восстановления водой подвергнутых сублимационной сушке наночастиц получали однородную и стабильную коллоидную систему. Возможность повторного получения суспензии наночастиц оценивали визуально. Для этого содержимое пробирки с подвергнутым сублимационной сушке составом восстанавливали водой до первоначального объема (2 мл) и слегка встряхивали пробирку в течение 2-4 мин. Применимые восстановленные составы выглядели как опалесцирующая жидкость без заметных агломератов или осадка. Образцы, содержавшие заметные агломераты или осадок, отбраковывали.

Методом фотокорреляционной спектроскопии (PCS) определили размер наночастиц, для чего аликвоту восстановленного состава (50 μл) ввели в пробирку нанокалибратора с 3 мл воды двойной дистилляции. Пробирку встряхнули и затем поместили в нанокалибратор Coulter N4MD (производства компании Coulter Electronics, Великобритания). Использовали следующие рабочие параметры:

угол рассеяния: 90°
температура: 25°
вязкость: 0,01 пуаз
показатель преломления: 1,333.

После стадии фильтрации или сублимационной сушки состава после восстановления было измерено наполнение лекарством реакционной смеси. С целью определения наполнения лекарством наночастицы отделили методом ультрафильтрации и затем методом спектрофотометрии осуществили количественное исследование свободного лекарства в фильтрате.

Для определения наполнения лекарством состава наночастиц содержимое пробирки с подвергнутым сублимационной сушке составом восстановили в 1 мл воды; в фильтрующую микроцентрифугу (Microcon 30 килодальтон, с ультратонким фильтром) поместили 400 μл состава и отделили наночастицы путем центрифугирования со скоростью 16000 об/мин в течение 50 мин. 100 μл чистого фильтрата поместили в кювету с 3 мл воды двойной дистилляции и с помощью спектрофотометра (Spectronics Hελios, Thermospectronic, Великобритания) измерили на волне 480 нм абсорбцию воды. Концентрацию лекарства в образце определили с использованием соответствующей калибровочной кривой.

Относительное наполнение лекарством (в процентах от общего количества лекарства) вычислили с помощью следующей формулы:

$$\% \text{ Наполнения лекарством } = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100\%,$$

в которой C_i означает исходную концентрацию лекарства в полимеризационной среде (мг/мл);

C_f означает концентрацию лекарства в фильтрате (мг/мл).

После полного растворения подвергнутого сублимационной сушке состава путем количественного исследования определили содержание лекарства (мг/пробирка). Концентрацию лекарства в растворе измерили методом спектрофотометрии с использованием калибровочной кривой.

Для определения содержания лекарства содержимое пробирки с подвергнутым сублимационной сушке составом растворили в 2 мл диметисульфоксида (в течение 3 часов при комнатной температуре); 100 μл этого раствора поместили в кювету спектрофотометра с 3 мл воды двойной дистилляции и с помощью спектрофотометра (Spectronics Hελios, Thermospectronic, Великобритания) на волне 480 нм измерили абсорбцию воды. Концентрацию лекарства в образце определили с использованием соответствующей калибровочной кривой.

Препарат 1

Наночастицы получили методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя. В 5 мл дихлорметана растворили 250 мг полимера (PLGA 75:25, молекулярная масса - 90000-126000 дальтон) и 25 мг доксорубицина. Органическую фазу влили в перемешиваемый водный раствор (25 мл), содержавший 0,5% ПВС в качестве стабилизатор, и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 15100 об/мин). Полученную первичную эмульсию дополнительно гомогенизировали с использованием гомогенизатора высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 400 бар. При пониженном давлении испарили дихлорметан (в роторном испарителе BUCHI R-200). Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 140-220 нм, наполнение доксорубицином составляло 40%.

Препарат 2

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA с кислотными концевыми группами и характеристической вязкостью η=0,20 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 2 мл 0,001 N HC1 растворили 25 мг гидрохлорида доксорубицина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19500 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ПВС и снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, после чего трижды пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов испарили дихлорметан. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 110-160 нм, наполнение доксорубицином составляло 75%.

Препарат 3

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA 75:25, молекулярная масса - 90000-126000 дальтон) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. 25 мг гидрохлодрида доксорубицина растворили в 2 мл 0,001 N HCl. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19 500 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ПВС, эту смесь снова гомогенизировали с использованием Ultra-Turrax T-25 и затем четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 160-330 нм, наполнение доксорубицином составляло 47%.

Препарат 4

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLA, η=0.36 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 2 мл 0,001 N HCl растворили 25 мг гидрохлодрида доксорубицина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19,500 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ПВС и снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, а затем четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 126-210 нм, наполнение доксорубицином составляло 42%.

Препарат 5

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA с

кислотными концевыми группами, η=0,20 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 2 мл 0,001 N HCl растворили 25 мг гидрохлодрида доксорубицина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19,500 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ПВС, снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, после чего трижды пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 140-200 нм, наполнение доксорубицином составляло 73%.

Препарат 6

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA 50:50 с кислотными концевыми группами, η=0,20 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 2 мл 0,001 N HCl растворили 25 мг гидрохлодрида доксорубицина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19,500 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ПВС, снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, после чего трижды пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 130-190 нм, наполнение доксорубицином составляло 67%.

Препарат 7

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA 50:50 с кислотными концевыми группами, η=0,20 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. 50 мг гидрохлодрида доксорубицина растворили в 2 мл 0,001 N HCl. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 20,100 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ПВС, снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, а затем четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 125-185 нм, наполнение доксорубицином составляло 69%.

Препарат 8

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA 50:50 с

кислотными концевыми группами, η=0,20 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 2 мл 0,001 N HCl растворили 25 мг гидрохлодрида доксорубицина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 22600 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора ЧСА, снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, а затем четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 100-200 нм, наполнение доксорубицином составляло 40%.

Препарат 9

Наночастицы получили методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя. 250 мг полимера (PLA, молекулярная масса - 90000-126000 дальтон) и 15,1 мг цетилфосфата сделали растворимыми в 4 мл дихлорметана. В 2 мл воды растворили 21,8 мг гидрохлодрида доксорубицина. Органический и водный растворы смешали и выдерживали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем смесь влили в перемешиваемый водный раствор (25 мл), содержавший 1% ЧСА в качестве стабилизатора и эмульгировали с использованием Ultra Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19100 об/мин). Полученную первичную эмульсию четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили при пониженном давлении (в роторном испарителе BUCHI R-200). Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 160-240 нм, наполнение доксорубицином составляло 60%.

Препарат 10

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA 50:50 с кислотными концевыми группами, η=0,20 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 2 мл 0,001 N HCl растворили 25 мг гидрохлодрида доксорубицина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19900 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 1% водного раствора TGPS, снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, а затем четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 300-380 нм, наполнение доксорубицином составляло 45%.

Препарат 11

Наночастицы получили методом гомогенизации под высоким давлением -

испарения растворителя. 250 мг полимера (PLA, 0,34 децилитр грамм) 21,2 мг холестерилового сульфата калия сделали растворимыми в 5 мл хлороформа. В 2 мл воды растворили 21,8 мг гидрохлодрида доксорубицина. Органический и водный растворы смешали и выдерживали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем смесь влили в перемешиваемый водный раствор (23 мл), содержавший 1% ПВС в качестве стабилизатора, и эмульгировали с использованием Ultra Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 19100 об/мин). Полученную первичную эмульсию четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили при пониженном давлении (в роторном испарителе BUCHI R-200). Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 500-600 нм, наполнение доксорубицином составляло 89%.

Препарат 12

Наночастицы получили методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя. 250 мг полимера (PLA, 0,34 децилитр грамм) и 22,9 мг D-α-токоферолсукцината сделали растворимыми в 5 мл хлороформа. В 2 мл воды растворили 25,4 мг гидрохлодрида доксорубицина. Органический и водный растворы смешали и выдерживали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем смесь влили в перемешиваемый водный раствор (23 мл), содержавший 0,5% ПВС в качестве стабилизатора, и эмульгировали с использованием Ultra Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 23600 об/мин). Полученную первичную эмульсию четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Хлороформ испарили при пониженном давлении (в роторном испарителе BUCHI R-200). Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 224-368 нм, наполнение доксорубицином составляло 50%.

Препарат 13

Наночастицы получили методом гомогенизации под высоким давлением - испарения растворителя. 250 мг полимера (PLA, 0,34 децилитр грамм) и 14,9 мг цетилфосфата сделали растворимыми в 5 мл хлороформа. В 2 мл воды растворили 24,5 мг гидрохлодрида доксорубицина. Органическую и водную фазы смешали и выдерживали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем смесь влили в перемешиваемый водный раствор (23 мл), содержавший 0,5% ПВС в качестве стабилизатора, и эмульгировали с использованием Ultra Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 23600 об/мин). Полученную первичную эмульсию четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Хлороформ испарили при пониженном давлении (в роторном испарителе BUCHI R-200). Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 200-250 нм, наполнение доксорубицином составляло 53%.

Препарат 14

Наночастицы получили методом двойной эмульсии. 500 мг полимера (PLGA 50:50 с

кислотными концевыми группами, η=0.67 децилитр грамм) сделали растворимыми в 3 мл дихлорметана. В 3 мл воды растворили 20 мг гидрохлодрида доксорубицина и 45 мг γ-циклодекстрина. Водный раствор влили в органическую фазу и эмульгировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25 (в течение 2 мин со скоростью 23600 об/мин). Полученную первичную эмульсию влили в 25 мл 0,5% водного раствора ПВС, снова гомогенизировали смесь с использованием Ultra-Turrax T-25, а затем четыре раза пропустили через гомогенизатор высокого давления (APV Micron Lab 40) при давлении 600 бар. Дихлорметан испарили путем перемешивания эмульсии при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную наносуспензию профильтровали через фильтр из пористого стекла и подвергли сублимационной сушке после добавления 5 мас./об.% маннитола в качестве криозащитного агента. Подвергнутый сублимационной сушке состав являлся целиком ресуспендируемым. Методом PCS определили, что частицы имели размер 200-250 нм, наполнение доксорубицином составляло 44%.

2. Исследование на животных

Система моделирования ортотопический опухоли

Использовали экспериментальную систему на основе интракраниально имплантированной крысам глиобластомы 101/8. Эту опухоль изначально получили путем местной инъекции гранулы α-диметилбензантрацена (DMBA) в мозжечок крыс Уистара и поддерживали непрерывными пассажами путем внутримозговой имплантации. Для длительного хранения опухолевую ткань выдерживали при температуре - 196°C и путем инъекции вводили в головной мозг крыс.

Глиобластома 101/8 применялась ранее в экспериментальной химиотерапии с использованием наполненных доксорубицином наночастиц на основе поли(бутил цианакрилата) с модифицированной поверхностью. Опухоль имеет стабильную мономорфную структуру и имеет характерные гистологические проявления агрессивной глиобластомы с быстрым диффузным ростом в паренхиме мозга и довольно медленной тенденцией некроза. Трансплантируемость опухоли составляла около 100%, в результате чего после инокуляции получали предсказуемый латентный период. Трансплантацию глиобластомы 101/8 в описываемом исследовании осуществляли с использованием свежей опухолевой ткани. Эта методика была выбрана с целью сохранения основных типичных свойств исходной опухоли, в особенности ее антигенной структуры и дифференциации.

Взрослых самцов крыс Уистара весом 200-250 г в течение 1 недели выдерживали с целью акклиматизации в клетках группами по пять особей. Им без ограничений давали стандартный лабораторный корм и воду. С целью имплантации опухоли животных подвергли глубокой анестезии путем внутрибрюшинной инъекции пентобарбитала (50 мг/кг). Через срединный сагиттальный разрез с помощью стоматологической бормашины было проделано трепанационное отверстие диаметром 1,5 мм в 2 мм за правым венечным швом и в 2 мм сбоку от срединного сагиттального разреза. Опухолевый материал (приблизительно 10^6 клеток) из замороженного запаса набрали в шприц для инъекций туберкулина, соединенный с иглой 21-го номера. Наконечник иглы ввели на 4 мм глубже поверхности костей и инъецировали опухолевую ткань в нижнюю часть правого бокового желудочка. Разрез скальпа зашили или закрыли клеем. После появления выраженных клинических признаков болезни (обычно на 14-й день) животных умертвили углекислым газом и затем обезглавили. Немедленно извлекли мозг. Опухоль рассекли и разрезали скальпелем; имплантат опухоли (5 мг) инокулировали в мозг новых подопытных

животных, как это описано выше. Путем повторных пробных экспериментов были подтверждены соответствующие координаты и уточнена методика.

Для испытания на животных использовали наночастицы на основе низкомолекулярного PLGA 50:50 с кислотными концевыми группами η=0,20 децилитр грамм), наполненные доксорубицином, а именно гидрохлодридом доксорубицина. Для получения наполненных доксорубицином наночастиц на основе PLGA использовали соотношение лекарства и полимера 1:10. Частицы имели размер 144±12 нм, наполнение доксорубицином составляло 75,5%.

Для получения покрытых поверхностно-активным веществом частиц подвернутый сублимационной сушке состав повторно суспендировали в 1% водном растворе поверхностно-активного вещества (Pluronic® F68, Pluronic® P85 и полисорбата 80). Затем полученные препараты инкубировали в течение 30 мин с одновременным помешиванием и использовали в течение 2 часов.

Крыс-носителей опухоли произвольно поделили на шесть групп (n=10) и давали один из следующих составов: 1) плацебо; 2) доксорубицин в физиологическом растворе (DOX); 3) доксорубицин в 1% Pluronic® F68 (Dox/F68); 4) наполненные доксорубицином наночастицы на основе PLGA (DOX-PLGA); 5) наполненные доксорубицином наночастицы на основе PLGA, покрытые Pluronic® F68 (DOX-PLGA/F68); 6) наполненные доксорубицином наночастицы на основе PLGA, покрытые полисорбатом 80 (не показаны); 7) наполненные доксорубицином наночастицы на основе PLGA, покрытые Pluronic® P85 (результаты не показаны на фиг.1).

Эти препараты вводили внутривенно в хвостовую вену согласно следующей схеме: 3×1,5 мг/кг на 2, 5 и 8 дни после имплантации опухоли.

Животных наблюдали в течение 100 дней после лечения; затем выживших животных умертвили и вскрыли. Результаты проиллюстрированы на фиг.1.

Все животные из контрольной группы погибли в течение 19 дней после имплантации опухоли. Наполненные доксорубицином наночастицы на основе PLGA, покрытые полоксамером 188, значительно увеличили выживаемость крыс-носителей опухоли: 40% животных (4 из 10) прожили по 100 дней. Из группы, получавшей доксорубицин в 1% растворе полоксамера 188, выжило только одно животное. Отсутствие опухоли у животных подтверждали морфологическим исследованием.

В отличие от результатов, полученных при использовании наполненных доксорубицином наночастиц на основе PLGA, покрытых полоксамером 188, при использовании для покрытия наполненных доксорубицином наночастиц полисорбатом 80 или Pluronic® P85 эффективность связанного наночастицами доксорубицина не повышалась (данные не показаны).

Во второй серии опытов исследовали действие in vivo составов, содержащих наполненные доксорубицином наночастицы на основе PLGA с кислотными концевыми группами (PLGA-COOH) и TPGS в качестве стабилизатора (Dox/PLGA-COOH/TPGS; препарат 10) или покрытых TPGS (Dox/PLGA-COOH+TPGS), на крыс-носителей глиобластома 101/8. Последний состав получили путем повторного суспендирования наночастицы согласно препарату 5 в 0,5% TPGS, после чего их инъецировали животным.

Результаты этой серии опытов показаны на фиг.2. Видно, что наночастицы согласно препарату 10, т.е. содержащие TPGS в качестве стабилизатора, значительно увеличивают продолжительность выживания крыс-носителей опухоли и обеспечивают длительное выживание у 20% крыс-носителей, использованных в этом опыте. Действие у наночастиц согласно препарату 5, которые до использования были покрыты TPGS,

отсутствовало.

Формула изобретения

1. Способ получения системы направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер, включающий стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид), по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество и липидное соединение, выбранное из группы липидных соединений, включающей цетилфосфат, холестериловый сульфат калия и токоферолсукцинат, в органическом растворителе с целью получения органической фазы, вливают органическую фазу в водный раствор, содержащий TPGS,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

гомогенизируют первичную эмульсию,

удаляют органический растворитель из первичной эмульсии и

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы.

2. Способ получения системы направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер, включающий стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид), по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество и липидное соединение, выбранное из группы липидных соединений, включающей цетилфосфат, холестериновый сульфат калия и токоферолсукцинат, в органическом растворителе с целью получения органической фазы,

вливают органическую фазу в водный раствор, необязательно содержащий стабилизатор,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

гомогенизируют первичную эмульсию,

удаляют органический растворитель из первичной эмульсии,

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы, и

покрывают наночастицы полоксамером 188.

3. Способ получения системы направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер, включающий стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид) в органическом растворителе с целью получения органической фазы, растворяют, по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество в водном растворе,

вливают водный раствор в органическую фазу,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

вливают первичную эмульсию в водный раствор TPGS,

гомогенизируют смесь первичной эмульсии и водного раствора TPGS,

удаляют органический растворитель из смеси первичной эмульсии и водного раствора стабилизатора, выбранного из группы, включающей поливиниловые

спирты, сывороточный альбумин, TPGS и γ-циклодекстрин, и

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы.

4. Способ получения системы направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер, включающий стадии, на которых:

делают растворимым поли(DL-лактид) и/или поли(DL-лактид-согликолид) в органическом растворителе с целью получения органической фазы,

растворяют, по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество в водном растворе,

вливают водный раствор в органическую фазу,

эмульгируют смесь, чтобы получить первичную эмульсию,

вливают первичную эмульсию в водный раствор стабилизатора,

гомогенизируют смесь первичной эмульсии и водного раствора стабилизатора,

удаляют органический растворитель из смеси первичной эмульсии и водного раствора стабилизатора, выбранного из группы, включающей поливиниловые спирты, сывороточный альбумин, TPGS и γ-циклодекстрин,

фильтруют полученную наносуспензию, содержащую наполненные лекарством наночастицы, и

покрывают наночастицы полоксамером 188.

5. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что поливиниловый спирт имеет молекулярную массу 30-70 килодальтон.

6. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что сывороточным альбумином является человеческий сывороточный альбумин.

7. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что фармакологически активным веществом является терапевтическое средство или диагностическое средство.

8. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что фармакологически активным веществом является терапевтическое средство, выбранное из группы, включающей лекарства, действующие на синаптические и нейроэффекторные соединительные участки; обезболивающие и анестезирующие средства общего и местного действия; снотворные средства и седативные средства; лекарства для лечения психиатрических расстройств, таких как депрессия и шизофрения; антиэпилептические средства и противосудорожные средства; лекарства для лечения болезни Гентингтона, старения и болезни Альцгеймера; антагонисты и нейротропные факторы моторных аминокислотных рецепторов и нейрорегенеративные средства; трофические факторы; лекарства для лечения повреждения ЦНС или нарушения мозгового кровообращения; лекарства для лечения привыкания и злоупотребления лекарственными средствами; физиологически активные вещества и противовоспалительные лекарства; хемиотерапевтические средства против паразитарных инфекций и микробных заболеваний; иммунодепрессивные средства и противораковые лекарства; гормоны и антагонисты гормонов; тяжелые металлы и антагонисты тяжелых металлов; антагонисты неметаллических токсичных веществ; цитостатики для лечения рака; диагностические вещества для применения в медицинской радиологии; иммуноактивные и иммунореактивные средства; медиаторы и их соответствующие агонисты и антагонисты рецепторов, их соответствующие предшественники или метаболиты; антибиотики, антиспазматические средства, антигистаминные средства, средства против рвоты, релаксанты, стимуляторы, "смысловые" и "антисмысловые"

олигонуклеотиды, средства для расширения сосудов головного мозга, психотропные средства, противоманиакальные средства, сосудорасширяющие и сосудосуживающие средства, антигипертензивные средства, средства для лечения мигрени, снотворные средства, гипер- или гипогликемические средства, минеральные или питательные добавки, лекарства против ожирения, анаболические средства и противоастматические средства и их смеси.

9. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что фармакологически активным веществом является противоопухолевое средство, выбранное из группы, включающей алкалоиды, алкилирующие средства, такие как алкилсульфонаты, азиридины, этиленимины и метилмеламины, азотистые иприты, нитрозомочевины, антибиотики и аналоги, предпочтительно антрациклины, антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пурина и аналоги пиримидина, ферменты, иммуномодулирующие средства, иммунотоксины, моноклональные антитела и комплексы платины.

10. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что фармакологически активным веществом является диагностическое средство, которое применяют для диагностики в радиационной медицине и/или при лучевой терапии.

11. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что органический растворитель выбирают из группы, включающей дихлорметан, хлороформ, этилацетат и их смеси.

12. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что после добавления криозащитного агента наносуспензию подвергают сублимационной сушке.

13. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что после добавления криозащитного агента наносуспензию подвергают сублимационной сушке, при этом криозащитным агентом является маннитол.

14. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что после добавления криозащитного агента наносуспензию подвергают сублимационной сушке, при этом криозащитный агент добавляют в наносуспензию в количестве 5 мас./об%.

15. Система направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер, содержащая наночастицы на основе поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида) и, по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество, абсорбируемое, адсорбируемое и/или включаемое в наночастицы, при этом система содержит TPGS или имеет покрытие из поверхностно-активного вещества плуроник 188, которое осаждают на наполненные лекарством наночастицы, отличающаяся тем, что систему получают способом по любому из пп.1-4.

16. Система направленной доставки лекарства для введения фармакологически активного вещества в центральную нервную систему млекопитающих через гематоэнцефалический барьер, содержащая наночастицы на основе поли(DL-лактида) и/или поли(DL-лактид-согликолида) и, по меньшей мере, одно фармакологически активное вещество, абсорбируемое, адсорбируемое и/или включаемое в наночастицы, при этом система содержит TPGS или имеет покрытие из поверхностно-активного вещества плуроник 188, которое осаждают на наполненные лекарством наночастицы, отличающаяся тем, что систему получают способом по любому из пп.1-4, при этом наночастицы представляют собой частицы, имеющие диаметр менее 1000 нм, предпочтительно от 100 до 800 нм и наиболее предпочтительно от 150 до 600 нм.

17. Способ лечения заболевания или расстройства центральной нервной системы млекопитающих, включающий стадии, на которых:

получают наполненные лекарством наночастицы на основе поли(DL-лактида) или поли(DL-лактид-согликолида),

покрывают наполненные лекарством наночастицы на основе PLGA полоксамером 188,

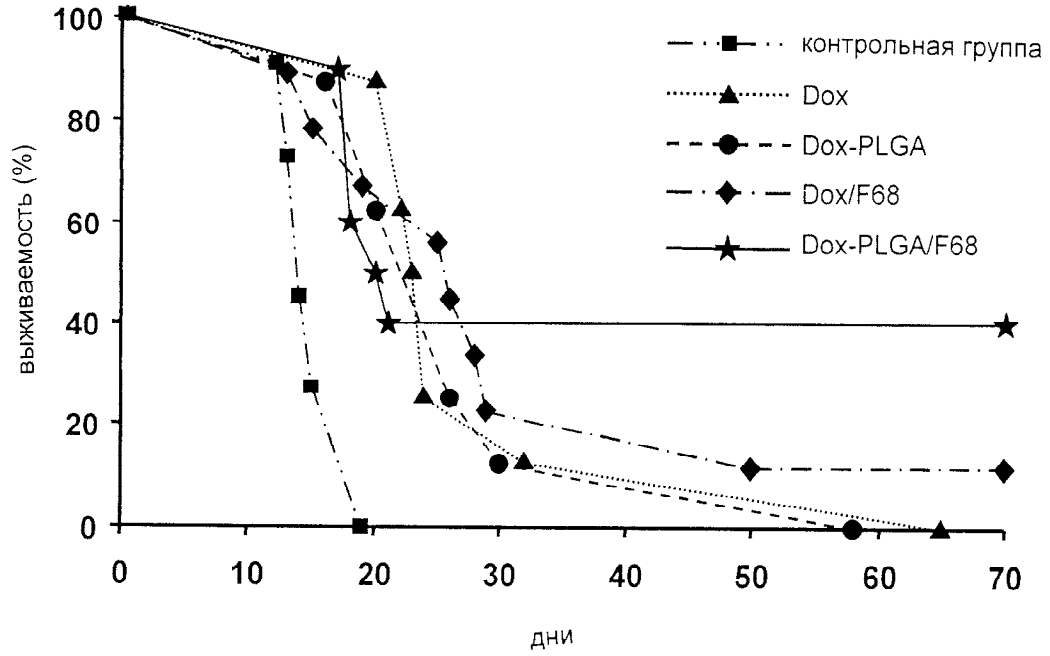
вводят покрытые полоксамером 188 наполненные лекарством наночастицы в кровоток млекопитающих и

дают лекарству оказать свое фармакологическое действие.

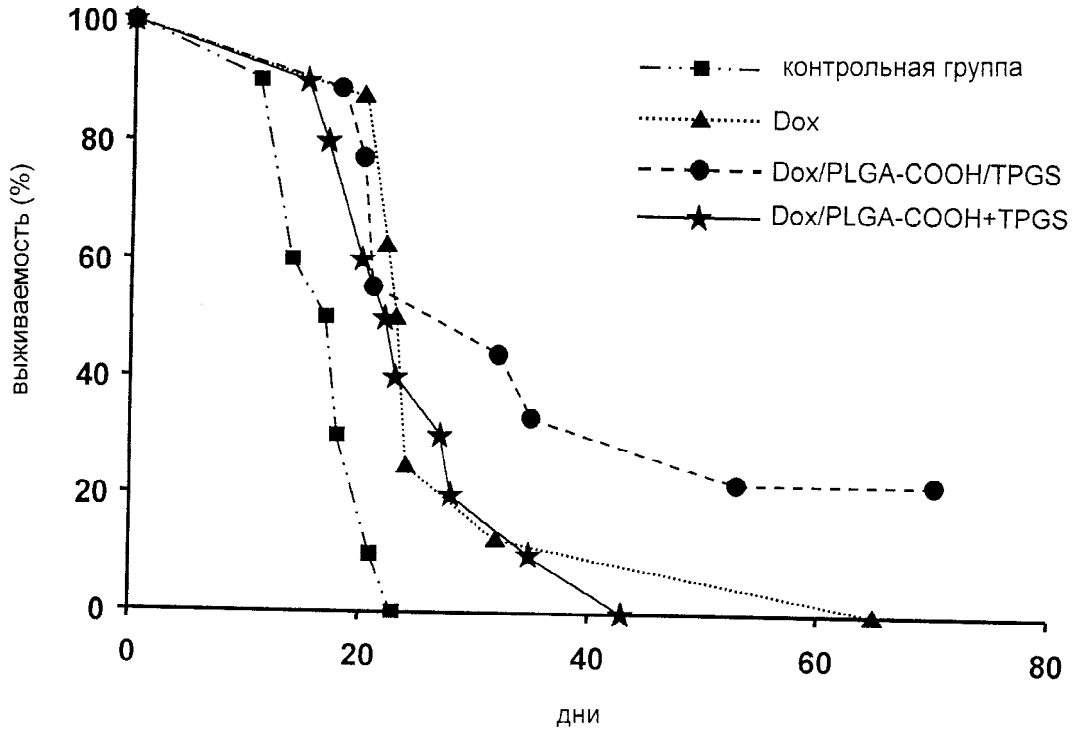
18. Способ по п.17, отличающийся тем, что стадия введения включает пероральное или внутривенное введение.

19. Применение системы направленной доставки лекарства по п.15 для лечения заболевания или расстройства центральной нервной системы млекопитающих.

20. Применение системы направленной доставки лекарства по п.16 для лечения заболевания или расстройства центральной нервной системы млекопитающих.


100
80
60
40
20
0
выживаемость (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
дни
контрольная группа
Dox
Dox-PLGA
Dox/F68
Dox-PLGA/F68

Фиг. 1


100
80
60
40
20
0
выживаемость (%)
0
20
40
60
80
дни
контрольная группа
Dox
Dox/PLGA-COOH/TPGS
Dox/PLGA-COOH+TPGS

Фиг. 2