(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039827 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.17

(21) Номер заявки
201690113

(22) Дата подачи заявки
2014.07.31

(51) Int. Cl. ***A61K 47/48*** (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01)
A61K 8/06 (2006.01)
A61K 8/55 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/14 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)

(54) ВЕЗИКУЛЯРНАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(31) **1313734.4; 1313735.1**
(32) **2013.07.31**
(33) **GB**
(43) **2016.05.31**
(86) **PCT/EP2014/066545**
(87) **WO 2015/014965 2015.02.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ООО "ПРО БОНО БИО" (RU)

(72) Изобретатель:
Гаррэвэй Ричард Вольф, Генри Вилльям (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-B1-7544375
US-A1-2012045405
US-A-5498420
WO-A2-03077861
US-A1-2010105139
EP-A1-2382994
WO-A2-2009106338
WO-A2-2009073193
WO-A1-2011162802
CEVC G: "Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery", CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US, vol. 13, no. 3/04, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 257-388, XP002107366, ISSN: 0743-4863, abstract

(57) Настоящее изобретение относится к везикулярным композициям для доставки Агента, Представляющего Интерес (АПИ), через кожу пациента, содержащим везикулы, которые содержат фосфолипид, неионогенное поверхностно-активное вещество и модифицированный компонент, при этом указанный модифицированный компонент представляет собой фосфолипид или поверхностно-активное вещество, связанные с указанным АПИ таким образом, что, когда указанный АПИ находится снаружи везикулы, то вся молекула АПИ находится с внешней стороны по отношению к везикулярной мембране, где фосфолипид представляет собой фосфатидилхолин; неионогенное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитана, полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтилен-лаурилового простого эфира; и АПИ выбран из группы, состоящей из структурного белка кожи, такого как эластин или коллаген, терапевтического белка, углевода, хромофорсодержащей макромолекулы, такой как порфирин, витамина, металла или соли металла, неметаллического элемента или соли неметалла, меланина, или противовоспалительного средства, такого как НПВС (нестероидное противовоспалительное средство). Кроме того, изобретение относится к способу доставки и получения указанной везикулярной композиции.

039827 B1

039827 B1

Настоящее изобретение относится к везикулярным композициям для применения при местном введении терапевтического, метаболического, косметического или структурного Агента, Представляющего Интерес (АПИ), и способам введения АПИ.

Патент US 6165500 описывает композицию для введения агентов, которая представляет собою мембраноподобные структуры, состоящие из одного или более слоев амфифильных молекул или амфифильного вещества носителя, в частности для транспортировки агента в и через природные барьеры, такие как кожа и подобные материалы. Эти Transfersomes™ содержат один или более компонентов, чаще всего смесь основных веществ, одно или более веществ с активностью на границе раздела фаз, и агенты.

Публикация заявки на патент США № US 2004/0071767 описывает композиции нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) на основе сложных агрегатов с по меньшей мере тремя амфифильными компонентами, суспендированными в фармацевтически приемлемой среде.

Публикация заявки на патент США № US 2004/0105881 описывает расширяемые поверхностные агрегаты, способные суспендироваться в пригодной жидкой среде, содержащие по меньше мере три амфифата (амфифатических компонента) и способные улучшать транспорт активных веществ через полупроницаемые барьеры, такие как кожа, особенно неивазивно вводимых лекарственных средств in vivo путем проникновения через барьер с помощью таких агрегатов. WO 2010/140061 описывает применение "пустых" везикулярных композиций для лечения боли в глубоких тканях. WO 2011/022707 описывает применение других композиций "пустых" везикул для лечения заболеваний, вызванных дефицитом жирных кислот и, в частности, заболеваний, вызванных воспалением. Везикулярные композиции, к которым могут быть присоединены терапевтические начала, описаны в WO 2011/022707 и WO 2011/140061.

Эти документы не описывают и не предлагают везикулярных композиций для применения при местном введении АПИ, и что АПИ могут быть ковалентно связаны с компонентом везикулы, так что большая часть АПИ находится снаружи везикулы. Цитирование любой ссылки в данном разделе заявки не является признанием того, что речь идет о предшествующем уровне техники изобретения. Приведенные выше публикации включены в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Липосомальные везикулы использовались в прошлом с целью доставки активных соединений (АПИ) в организм.

Эластичные формы липосом (Transfersomes®) являются везикулами, изготовленными из комбинации жира (например, соевый фосфатидилхолин) и жирной кислоты или поверхностно-активного вещества (например, Tween), которые могут проходить через поверхность кожи. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) в поверхностно-активном веществе этих везикул является гигроскопическим и проникает в поры кожи вдоль градиента воды. Эти везикулы были протестированы в качестве средства для транспортировки других АПИ в организм трансдермальным путем, либо путем размещения транспортируемого АПИ внутри просвета везикулы или включения АПИ в мембрану везикулы, в качестве одного из мембранных компонентов.

Любой из этих способов должен полагаться на какую-то форму разрушения везикулы для того, чтобы освободить АПИ.

Кроме того, существуют продукты, которые желательно транспортировать через кожу и которые являются либо слишком большими, чтобы быть включенными в трансферсому на этом пути, или которые обладают химическими свойствами, которые несовместимы с нормальными химическими свойствами этих везикул.

Кроме того, когда некоторые из ПЭГ-содержащих поверхностно-активных компонентов заменяются АПИ, это влияет на эластичность везикулы и негативно влияет на движущую силу.

Настоящее изобретение преодолевает эти проблемы путем физического прикрепления АПИ к везикуле, так что везикула действует исключительно в качестве механического устройства, затягивая желаемый АПИ под поверхность кожи.

Данные везикулы в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для транспортировки других компонентов/АПИ в организм с помощью трандермального пути, путем присоединения таких компонентов или АПИ к компоненту везикулы, так что АПИ находится снаружи везикулы.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает, в первом аспекте, везикулярную композицию для доставки Агента, Представляющего Интерес (АПИ), через кожу пациента, содержащую везикулы, которые содержат фосфолипид, неионогенное поверхностно-активное вещество и модифицированный компонент, при этом указанный модифицированный компонент представляет собой фосфолипид или поверхностно-активное вещество, связанные с указанным АПИ таким образом, что, когда указанный АПИ находится снаружи везикулы, то вся молекула АПИ находится с внешней стороны по отношению к везикулярной мембране, где фосфолипид представляет собой фосфатидилхолин; неионогенное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитана, полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтилен-лаурилового простого эфира; и

АПИ выбран из группы, состоящей из структурного белка кожи, такого как эластин или коллаген, терапевтического белка, углевода, хромофорсодержащей макромолекулы, такой как порфирин, витамина, металла или соли металла, неметаллического элемента или соли неметалла, меланина, или противо-

воспалительного средства, такого как НПВС (нестероидное противовоспалительное средство).

Предпочтительно, большая часть АПИ, более предпочтительно вся молекула АПИ находится снаружи везикулы. АПИ может быть ковалентно связан с компонентом, так что он присутствует на внешней поверхности везикулы.

Под АПИ, который находится снаружи везикулы, понимают, что эти АПИ являются "внешней облицовкой". Во время получения везикул, в то время как поверхностно-активное вещество или липидный компонент, который связан с АПИ, смешан с немодифицированными компонентами, ориентация модифицированной молекулы не может контролироваться. Таким образом, около 50% молекул, к которым присоединен АПИ, будет в "неправильной" ориентации, и это означает, что часть АПИ будут находиться в просвете везикулы. Среди модифицированных молекул, которые находятся в "правильной" ориентации, так что АПИ находится снаружи везикулы по меньшей мере 50% самой молекулы АПИ, в показателях физического размера/объема, находится с внешней стороны по отношению к везикулярной мембране. Способ получения может привести к меньшей доле АПИ, находящегося снаружи везикулы, то есть внешняя концентрация АПИ может быть в диапазоне 1%-10% (включая 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% или 9%), 10%-50%, 15%-45%, 20%-40% или 25%-30% (мас./об.) всего АПИ в композиции. Под внешней концентрацией понимают концентрацию АПИ, которая доступна для высвобождения и/или оказывает свое терапевтическое действие, как только везикулы проникают в кожу.

Преимущества везикулярной композиции настоящего изобретения состоят в скорости, глубине и количестве АПИ и размере и характере АПИ, который проникает в кожу, когда АПИ связан с везикулой и наносится местно.

Композиция может быть кремом, лосьоном, мазью, гелем, раствором, спреем, лаком, муссом или пленкообразующим раствором.

Везикулярная композиция может содержать, а может и не содержать любой известный терапевтический агент, другой, нежели АПИ, связанный с везикулой. Везикулярная композиция, содержащая АПИ, может содержать, а может и не содержать любой дополнительный биологически активный или фармацевтически активный продукт. Биологически активный или фармацевтически активный агент определяется в данном документе как агент, который имеет фармакологическую, метаболическую или иммунологическую активность.

Изобретение охватывает везикулярные композиции, содержащие один или более фосфо или сульфолипидов и одно или более поверхностно-активных веществ, которые являются эффективными для доставки АПИ. Поверхностно-активное вещество может быть неионным.

Везикулярная композиция настоящего изобретения способна (не желая быть связанными теорией) достигать свою функцию посредством уникальных свойств везикул, которые являются двухслойными везикулами, содержащими поверхностно-активное вещество и липид, такой как соевый фосфатидилхолин. Уникальность везикулы является следствием включения в композицию определенного количества неионогенного поверхностно-активного вещества, которое изменяет фосфолипидную мембрану до такой степени, что полученные везикулы находятся в постоянном жидкокристаллическом состоянии, и, вместе с тем, поверхностно-активное вещество также придает мембране стабильность, везикулы являются ультрадеформируемыми и стабильными (имеют уменьшенную жесткость, без разрушения).

Везикулярная композиция содержится/образуется в везикулах, суспендированных в, например, водном буфере, который наносится местно. Везикулы из везикулярной композиции содержат двухслойную или однослойную мембрану, окружающую пустую сердцевину. Они имеют размеры в диапазоне от 60 нм в диаметре до 200 нм в диаметре и могут изменяться в диапазоне от 100 до 150 нм в диаметре. Везикулы являются сильно гидрофильными, и это свойство, вместе с их ультрадеформируемостью, является ключом к их способности транспортировать через кожу. Когда композиция изобретения наносится на кожу и ей дают высохнуть, движущая сила регидратации везикул в сочетании с их деформируемостью приводит к движению везикул к областям с более высоким содержанием воды на и под барьером проницаемости кожи. Это является движущей силой их движения через поры кожи и внутриклеточных просветов. Определенное соотношение поверхностно-активного вещества к неионогенному поверхностно-активному веществу способствует трансдермальной доставке везикул. Движение везикул через поры и внутриклеточные просветы несет или тянет вместе с ними и АПИ. После того, как они проходят через кожу, везикулы изобретения, в конечном счете, присутствуют в форме неповрежденных везикул. Эффективный клиренс везикул не происходит с помощью кожных микрососудов крови (капилляров), вследствие их относительно большого размера, но изобретатели предположили, что они транспортируются с интерстициальной жидкостью в другие и/или более глубокие ткани ниже места нанесения на кожу. Доклинические исследования, проведенные с везикулами изобретения, помеченными молекулой маркером (кетопрофен), показали, что везикулы не попадают в сосуды, потому что, после местного нанесения, высокая концентрация молекулы маркера наблюдалась локально с низкой системной абсорбцией.

АПИ может быть связан с поверхностно-активным компонентом или с липидным компонентом везикулы. Кроме того, и липидный компонент, и поверхностно-активный компонент везикулы могут иметь АПИ, связанный с ними.

Везикулярная композиция может иметь один или множество АПИ, связанных с ее внешней поверх-

ностью. Когда связано множество АПИ, тогда все АПИ могут быть одинаковыми, т.е. гомогенными, или АПИ могут быть разными, т.е. гетерогенными.

АПИ может быть элементом, ионом, низкомолекулярным соединением, углеводом, липидом, аминокислотой, пептидом, белком, макромолекулой или макроциклической молекулой. АПИ может быть питательным микроэлементом.

АПИ может быть структурным белком кожи (таким как эластин или коллаген), терапевтическим белком, порфирином или хромофорсодержащей макромолекулой, витамином, диоксидом титана, оксидом цинка, меланином или аналогом меланина. АПИ может быть пептидом или противовоспалительным лекарственным средством, таким как НПВС. В частности, АПИ может быть тетрапептид-7, трипептид-1, аскорбиновая кислота, напроксен или диклофенак.

АПИ может быть связан ковалентно или связан иным способом непосредственно либо с фосфолипидом, либо с поверхностно-активным компонентом везикулы или липидным компонентом везикулы. Может быть желательно использовать линкер или мостик, который ковалентно или иным способом связан и с жирной кислотой, поверхностно-активным компонентом или липидным компонентом, и с АПИ. В одном из примеров, если был добавлен неорганический АПИ (например, соль или оксид металла), дополнительный линкер, например, металлхелатирующий агент, такой как ЭДТА, может быть сначала конъюгирован с компонентом везикулы. В другом примере может быть желательно использовать более длинную молекулу, например, полимер (такой как полиэтиленгликоль; ПЭГ), чтобы облегчить эффективность процесса связывания и/или эффективность связывания АПИ. Такие линкеры/более длинные мостиковые молекулы будут особенно полезны, когда желательно удерживать АПИ на таком расстоянии от везикулы, чтобы предотвратить его вмешательство в саму мембрану. Это может иметь место, если АПИ является очень гидрофобным.

Большие молекулы или макромолекулы могут быть ковалентно связаны с компонентом(ми) везикулы. Примеры включают структурные белки кожи, такие как коллаген и эластин; терапевтические белки; и ферменты.

Множество АПИ могут быть связаны с липидом или поверхностно-активным компонентом, присутствующим на внешней поверхности везикулы, так что, как только проникают через кожу, они продолжают присутствовать на поверхности везикулы. Примеры включают антиоксиданты; витамины; неорганические соединения, такие как TiO_2 и ZnO; молекулы порфиринов для применения в фотодинамических видах терапии.

Транспортировка витаминов в организм через кожу может либо заменить отсутствующую способность производить витамины (например, витамин D), повысить способность кожи (или любого другого органа) защитить и восстановить саму себя (например, витамины C и E), или вылечить кожные или другие состояния, такие как себорейный дерматит (например, витамин B_7). Ссылка на кожу включает общую кожу тела и любой другой внешний покров, такой как эпителий уха, носа, горла и глаз, в том числе склера глаза, и другие слизистые оболочки, такие как влагалище и анус/прямая кишка.

Витамин D на самом деле представляет собой группу жирорастворимых соединений, ответственных за повышение кишечной абсорбции кальция и фосфатов. Наиболее важным из этой группы является D_3 (холекальциферол) и D_2 (эргокальциферол). Дефицит витамина D вызывает остеомаляцию (рахит у детей), и низкие уровни связывают с низкой минеральной плотностью костной ткани.

Кожа млекопитающих производит витамин D_3 под действием УФ-излучения из его предшественника, 7-дегидрохолестерола, и обеспечивает около 90% нашего витамина D. Солнцезащитный крем поглощает ультрафиолетовое излучение и предотвращает его попадание на кожу. Сообщалось, что солнцезащитный крем с фактором защиты от солнца (ФЗО) 8 на основе спектра УФВ может уменьшить способность синтезировать витамин D на 95%, в то время как солнцезащитный крем с ФЗО 15 может уменьшить способность синтезировать на 98%.

Совсем недавно наблюдалась тенденция к увеличению использования солнцезащитных кремов с более высоким ФЗО (от ФЗО 25 до ФЗО 50) и продуктов с полным блокированием солнечного излучения вследствие возросшей общественной осведомленности о вреде загара. Кроме того, и косметические средства по уходу за кожей, и окрашенные косметические продукты имели солнцезащитные добавки с ФЗО 15, 20 и 25 к их составам для обеспечения степени защиты от солнца.

Когда композиция содержит витамин D_3 (о которой не говорится, что она также не содержит витамин C, и/или E, и/или B_7), композиция может быть введена в солнцезащитный продукт, продукт, блокирующий солнечное излучение, или в продукт после загара, или другой продукт по уходу за кожей, или косметический продукт для пополнения низких уровней витамина D. Низкие уровни витамина D могут быть вызваны условиями низкой освещенности или использованием солнцезащитного крема, который может предотвратить производство витамина D в организме.

Таким образом, настоящее изобретение может связать витамин D_3/холекальциферол с эластичной трансдермальной везикулой, т.е. с композицией, содержащей липид и поверхностно-активное вещество, путем привязывания витамина к его внешней поверхности. Полученная композиция затем может быть включена в солнцезащитные кремы, композиции после загара и косметические продукты, которые содержат солнцезащитный крем. Эта "комбинация везикула/витамин D" будет проникать в кожу и достав-

лять его в базальный слой и шиповатые слои в эпидермисе.

В организме холекальциферол (витамин D_3) сначала преобразуется в кальцидиол в печени. Циркулирующий кальцидиол затем превращается в кальцитриол, биологически активную форму витамина D, в почках. Низкий уровень кальцидиола в крови (25-гидрокси-витамин D) может быть результатом избегания солнца. Таким образом, изобретение включает связывание либо кальцидиола, либо кальцитриола с трансдермальной везикулой путем связывания или привязывания к компоненту везикулы.

Некоторые другие витамины, например, витамин С и витамин Е, имеют важные антиоксидантные свойства, и это является причиной их включения в продукты по уходу за кожей для уменьшения признаков старения и повреждения кожи.

Наиболее биологически активной формой витамина Е является жирорастворимый α-токоферол, и один из вариантов настоящего изобретения предполагает связывание α-токоферола с компонентом везикулы для включения в композиции по уходу за кожей, в том числе солнцезащитные кремы и продукты после загара для улучшения состояния кожи, поврежденной солнцем. Витамин С (водорастворимый аскорбат) является кофактором многих ферментативных реакций, включая несколько реакций синтеза коллагена. Эти реакции играют важную роль в заживлении ран и в предотвращении кровотечения из капилляров. Таким образом, настоящее изобретение включает связывание аскорбата с компонентом везикулы, для включения в композиции по уходу за кожей и композиции для ухода за кожей при загаре, для улучшения состояния поврежденного коллагена и для включения в продукты по уходу за ранами.

Таким образом, когда питательный микроэлемент содержит витамин С и/или витамин Е, композиция может быть включена в солнцезащитный продукт, продукт против загара, продукт после загара или другой продукт по уходу за кожей или косметический продукт для восполнения эпидермального и дермального витамина С и/или витамина Е и предотвращения или помощи в восстановлении поврежденной солнцем или стареющей кожи.

Витамин B_7 (водорастворимый биотин) является коферментом для ферментов карбоксилазы. Недостаток биотина может вызвать дерматит в виде сыпи. Кроме того, пациенты с фенилкетонурией (неспособность усваивать фенилаланин) имеют формы экземы и себорейного дерматита, которые могут быть облегчены за счет увеличения уровней диетического биотина.

Таким образом, когда питательный микроэлемент содержит витамин B_7, композиция может быть включена в солнцезащитный продукт, продукт против загара, продукт после загара или другой продукт по уходу за кожей или косметический продукт для восполнения эпидермального и дермального витамина B_7 и облегчения дерматозов, связанных с дефицитом этого витамина.

Пептиды, такие как тетрапептид-7 или трипептид-1, могут быть связаны с жирной кислотой или поверхностно-активным веществом мембраны везикулы. Тетрапептид-7 может быть полезен при борьбе с воспалением и стимулированием регенерации кожи путем продуцирования коллагена. Это означает, что он особенно полезен в уходе за кожей и в качестве продуктов, замедляющих старение. Трипептид-1 имеет подобное действие. Эффективность доставки через внешний слой кожи может обеспечить повышенное действие при более низких уровнях/концентрациях, таким образом, уменьшая возможные побочные эффекты, вытекающие из подавления интерлейкинов.

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) являются болеутоляющими агентами, обычно используемыми для облегчения симптомов остеоартрита, боли в суставах связанной со спортом, боли в спине, головной боли и зубной боли. Примерами НПВС являются аспирин, ибупрофен, диклофенак и напроксен. Опять же, действенность и эффективность доставки таких лекарственных средств непосредственно в место боли и воспаления может привести к использованию более низких и/или целевых дозировок и, таким образом, снизить или устранить побочные эффекты, такие как проблемы желудочно-кишечного тракта, проблемы почек и проблемы сердца.

Изобретение может включать связывание большего количества небольших неактивных АПИ с поверхностью везикулы, так что, расположившись под кожей, она закрепляется, и долгое время наблюдается польза от присутствия самой везикулы, например, может быть улучшено удерживание воды, поддержка структуры.

АПИ может быть связан (или прикреплен, или привязан) к поверхностно-активному компоненту везикулы. Связывание с поверхностно-активным веществом может быть непосредственным к поверхностно-активному веществу с помощью сложноэфирной связи, если молекула имеет гидроксильную группу. Альтернативным способом связывания является замена атома или функциональной группы поверхностно-активного вещества (например, в случае Tween, полиэтиленгликолевый полимер) АПИ. Третьим способом связывания является непосредственное присоединение к жирной кислоте, необязательно через сложноэфирную связь. Если АПИ представляет собой неорганическую молекулу, затем дополнительно связанная молекула может быть сначала конъюгирована с компонентом везикулы, например, металлхелатирующим агентом, таким как ЭДТА, в случае соли металла. Если желательно, чтобы АПИ удерживался на некотором расстоянии от везикулы, для того чтобы максимизировать его эффективность (например, чтобы раскрыть активный сайт на АПИ, который является ферментом), может иметься связывающая молекула, например, полимерная цепь (например, полиэтиленгликоль), которая одновременно

связывает компонент везикулы и АПИ.

АПИ может быть присоединен (связан или привязан) к липидному компоненту везикулы. Связывание с липидом может быть обеспечено с помощью любой из гидроксильных групп глицерина посредством сложноэфирной связи, например, путем удаления жирной кислоты и заменой ее АПИ. В качестве альтернативы, способом крепления может быть замена фосфатидильного фрагмента, так что конечная молекула имеет две цепи жирных кислот вместе с привязанным АПИ. Возможны модифицированные липидные вставки в алифатической области как с нормальным, так и со свободным вращением на глицериновой матрице, где привязанный АПИ будет располагаться снаружи везикулы. Амидная связь может быть использована как более стабильная альтернатива, если необходимо привязать АПИ к везикуле на более длительный срок. Это может быть желательно, например, если цель для АПИ располагается в глубоких тканях, таких как суставы, а не в верхних дермальных слоях. Может быть использована комбинация менее стабильных и более стабильных связей (например, сложноэфирных и амидных, соответственно), чтобы обеспечить ступенчатое высвобождение АПИ.

Способ связывания с любым компонентом может быть гидролизуемым или негидролизуемым. Если желательно, чтобы АПИ отделялся непосредственно в или под кожей, связь должна быть гидролизуемой. Если желательно, чтобы связанный АПИ оставался присоединенным к везикуле в или под кожей, связь должна быть негидролизуемой.

АПИ может быть ковалентно связан или конъюгирован с компонентом мембраны; связь может быть гидрофильной, или гидрофобной, или гидростатической; связь может быть водородной связью, ионной связью.

Термины "связывание", "присоединение" и "привязывание" используются в данном документе как взаимозаменяемые и охватывают все связи, упомянутые выше.

Настоящее изобретение может быть использовано для введения АПИ в кожу млекопитающих. Может быть включено любое млекопитающее, в том числе люди, собаки, кошки, лошади, животные, производящие продукты питания, и домашние животные. АПИ может быть терапевтическим началом, или косметическим началом, или нетерапевтическим, или некосметическим началом, в качестве альтернативы или в дополнение, АПИ может быть метаболическим и/или структурным началом.

Второй аспект изобретения предлагает способ доставки АПИ через кожу субъекта, причем способ включает местное нанесение на кожу пациента везикулярной композиции изобретения в количестве, достаточном для проникновения через кожу и доставки АПИ.

Данное изобретение предлагает также способ доставки более чем одного АПИ через кожу пациента, причем способ включает местное нанесение или везикулярной композиции настоящего изобретения, где везикулы имеют гетерогенное множество АПИ, связанных с ними, и/или нанесение везикулярной композиции настоящего изобретения, где композиция представляет собой смесь везикул, где композиция имеет везикулы, которые имеет различные однородные или гомогенные множества АПИ. связанных с ними.

Липидом в везикулярных композициях может быть фосфолипид. Может присутствовать второй липид, которым может быть лизофосфолипидом. Липидом может быть сульфолипид. Поверхностно-активным веществом может быть неионогенное поверхностно-активное вещество.

Композиции изобретения образуют везикулы или другие агрегаты с расширенной поверхностью (АРП), где везикулярные композиции имеют улучшенную способность проникновения через полупроницаемые барьеры, такие как кожа. Размер везикулы препятствует проникновению в сосудистую систему и, как результат, предотвращает системную доставку. В то время как не ограничены каким-либо механизмом действия, композиции изобретения способны образовывать везикулы, которые характеризуются деформируемостью и/или адаптируемостью.

Конкретный состав везикулярной композиции будет определяться, в какой слой коже может быть доставлен АПИ. Некоторые композиции проникают только в верхние слои кожи, тогда как другие композиции будут двигаться в более глубокие слои. Везикулярная композиция будет выбрана в зависимости от доставляемого АПИ. Например, если коллаген является АПИ, который должен быть доставлен в глубокие слои кожи, он будет прикреплен к везикулярной композиции, которая способна проникать в глубокие слои кожи.

В третьем аспекте изобретение предлагает способ изготовления везикулярной композиции в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения. Способ включает прикрепление АПИ к везикулярному компоненту, смешивания АПИ/компонента с немодифицированным фосфолипидом и поверхностно-активным веществом с образованием везикулярных композиций изобретения.

Изобретение предлагает везикулярную композицию в соответствии с первым аспектом, в которой АПИ представляет собой витамин, такой как витамин С, витамин Е, витамин D или витамин А, для применения в продукте по уходу за кожей, для применения в продукте против старения или для применения в продукте для защиты от солнца (УФ защита).

Также предлагается везикулярная композиция в соответствии с изобретением, в которой АПИ представляет собой пептид, например, тетрапептид-7 или трипептид-1, для применения в продуктах против старения, для применения в стимулировании, или повышении продуцирования коллагена, или для применения в косметических продуктах.

Также предлагается везикулярная композиция в соответствии с изобретением, в которой АПИ представляет собой НПВС, такое как напроксен или диклофенак, для применения в лечении остеоартрита, для применения в лечении боли суставов, пораженных артритом, для применения в лечении мышечной боли, для применения в лечении растяжения мышц или для применения в лечении воспаления.

Как будет понятно, другие АПИ могут быть привязаны к везикулам изобретения для лечения широкого спектра заболеваний.

Во время изготовления везикул регулируется соотношение модифицированных компонентов (т.е. с присоединенными АПИ) к немодифицированным компонентам (т.е. без присоединенных АПИ) для контроля как степени, в которой несколько модифицированных компонентов (и, таким образом, АПИ) включены в везикулы, так и количества везикул, которые содержат, по меньшей мере, один АПИ. Если доля немодифицированных везикул остается неизменной в конечной композиции, они будут дополнять "затягивающее" действие модифицированных форм, следуя за ними в поры кожи и "подталкивая" сзади. Процент модифицированных везикул (как доля от общего количества везикул) в конечной композиции может варьироваться в диапазоне от 0,1% до 100%, или от 1% до 100%, от 10% до 90%, от 25% до 75% или 50%.

Чтобы убедиться в том, что высокая доля везикул имеет желаемый присоединенный АПИ или имеет несколько присоединенных АПИ, 100% модифицированное поверхностно-активное вещество может быть использовано для смешивания с липидом (или наоборот). На другом конце шкалы, для более ослабленного действия, когда только несколько везикул имеют прикрепленный АПИ или только один прикрепленный АПИ к везикулам, например, используется смесь 5% модифицированного - 95% немодифицированного поверхностно-активного вещества. Однако обычно от 80% до 10% липида или поверхностно-активного вещества заменяют модифицированным липидным компонентом или поверхностно-активным веществом. Может быть заменено от 75% до 15% липидного компонента или поверхностно-активного компонента. Приемлемо, когда в диапазоне от около 70%, 65%, 60%, 50%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% до 10% или в любом диапазоне между этими значениями или липидного компонента, или поверхностно-активного компонента может быть заменено модифицированным липидным компонентом или модифицированным поверхностно-активным компонентом, связанным с АПИ, соответственно. Соотношение как липидного компонента, так и поверхностно-активного вещества может быть заменено. Дополнительная очистка может быть проведена путем экстракции модифицированных везикул и смешивания их в точной "дозе" с чистыми немодифицированными везикулами, или путем смешивания с модифицированными везикулами с другим АПИ. Как правило, номенклатура, используемая в данном документе и лабораторных методиках в органической химии, медицинской химии, фармакологии, описанной в данном документе, является хорошо известной и обычно используется в данной области. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, как правило, имеют тот же смысл, обычно понимаемый средним специалистом в области техники, к которой принадлежит данное описание.

Используемый в данном документе термин "достаточное количество", "эффективное количество для" или "количество, достаточное для достижения конкретного результата", относится к количеству композиции изобретения, которое эффективно для получения желаемого эффекта, который необязательно является терапевтическим эффектом (т.е. при введении терапевтически эффективного количества). В качестве указанной альтернативы, "терапевтически эффективное" количество представляет собой количество, которое обеспечивает некоторое облегчение, смягчение и/или снижение, по меньшей мере, одного клинического симптома. Клинические симптомы, связанные с расстройством, которое можно лечить с помощью способов изобретения, хорошо известны специалистам в данной области техники. Кроме того, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что терапевтические эффекты не будут полными или лечебными, до тех пор пока субъект не получит какую-либо пользу.

Как используется в данном документе, термины "лечить", "лечение" или "терапия" означают, что тяжесть состояния субъекта снижается, или, по меньшей мере, частично улучшается, или облегчается, и/или достигается некоторое облегчение, смягчение или уменьшение, по меньшей мере, одного клинического симптома, и/или они ингибируются или задерживается развитие состояния, и/или задерживается развитие начала заболевания или болезни. Термины "лечить", "лечение" или "терапия" означают также управление болезненным состоянием. "Профилактика" означает профилактическое лечение.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый", когда используется в отношении композиции изобретения, означает, что композиция не приводит к неприемлемому уровню раздражения у субъекта, которому вводится композиция. Предпочтительно, такой уровень будет достаточно низким, чтобы обеспечить композиции пригодность для одобрения регулирующими органами.

Как используется в данном документе по отношению к числовым значениям, термин "около" означает интервал, окружающий определенные числовые значения, который включает то, что можно было бы ожидать как результат нормальной экспериментальной ошибки при проведении измерений. Например, в некоторых вариантах реализации, термин "около", когда используется в связи с конкретным чи-

словым значением, означает ±20%, если специально не указано что ±1%, ±2%, ±3%, ±4 % ±5%, ±10%, ±15% или ±20% от численного значения.

Композиция изобретения, при условии, что содержит, по меньшей мере, один липид, предпочтительно фосфо или сульфолипид, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество, предпочтительно неионное поверхностно-активное вещество, необязательно, суспендирована в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно в водном растворе, предпочтительно имеет pH в диапазоне от 3,5 до 9,0, предпочтительно от 4 до 7,5. Композиция изобретения может, необязательно, содержать буферы, антиоксиданты, консерванты, бактерицидные агенты, противомикробные агенты, смягчающие агенты, сорастворители и/или загустители. Композиция изобретения может содержать смесь более чем одного липида, предпочтительно более чем одного фосфолипида. Композиция изобретения может состоять в основном из, по меньшей мере, одного липида, предпочтительно фосфолипида, по меньшей мере, одного поверхностно-активного вещества, предпочтительно неионного поверхностно-активного вещества, фармацевтически приемлемого носителя и необязательно буферов, антиоксидантов, консервантов, бактерицидных агентов, противомикробных агентов, смягчающих агентов, сорастворителей и/или загустителей. Композиция изобретения может состоять из, по меньшей мере, одного липида, предпочтительно фосфолипида, по меньшей мере, одного поверхностно-активного вещества, предпочтительно, неионного поверхностно-активного вещества, фармацевтически приемлемого носителя и одного или более из следующих: буферы, антиоксиданты, консерванты, бактерицидные агенты, противомикробные агенты, смягчающие агенты, сорастворители и загустители.

В табл. 1 приведены предпочтительные фосфолипиды в соответствии с изобретением.

Таблица 1

Бехен(о)ил
Эрука(о)ил
Арахин(о)ил
Гадолен(о)ил
Арахидон(о)ил
Оле(о)ил
Стеар(о)ил
Линол(о)ил
Линоле(н/о)ил
Пальмитоле(о)ил
Пальмит(о)ил
Мирист(о)ил
Лаур(о)ил
Капр(о)ил

Предпочтительные липиды в контексте настоящего описания являются незаряженными и образуют стабильные хорошо гидратированные бислои; фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелины являются наиболее видными представителями таких липидов. Любой из них может иметь цепи, приведенные в табл. 1; предпочтительными является те, которые образуют двухслойные жидкие фазы, в которых липидные цепи находятся в неупорядоченном состоянии.

Различные отрицательно заряженные, т.е. анионные, липиды также могут быть включены в везикулярные липидные бислои. Привлекательными примерами таких заряженных липидов являются фосфатидилглицерины, фосфатидилинозитолы и, несколько менее предпочтительными, фосфатидная кислота (и ее сложный алкиловый эфир) или фосфатидилсерин. Это реализуется любым специалистом в данной области, и что является менее похвальным создать везикулы только из заряженных липидов, чем использовать их комбинацию с электронейтральным(и) двухслойным(и) компонентом(ми). В случае использования заряженных липидов, буферную композицию и/или регулятор pH обязательно выбирают таким образом, чтобы обеспечить требуемую степень ионизации головной группы липида и/или желаемую степень электростатического взаимодействия между противоположно заряженными молекулами лекарственного агента и липида. Кроме того, как в случае с нейтральными липидами, заряженные двухслойные липидные компоненты в принципе могут иметь любую из фосфолипидных цепей, как указано в табл. 1. Однако цепи, образующие жидкую двухслойную липидную фазу, являются явно предпочтительными, и в связи с повышающей ролью адаптивности везикулы, благодаря увеличивающейся текучести жирной це-

пи, и в связи с лучшей способностью липидов в жидкой фазе смешиваться друг с другом.

Липидная цепь, производная от жирной кислоты или жирного спирта, обычно выбирается среди основных типов алифатических цепей, приведенных ниже.

Додекановая	цис-9-Тетрадекановая	10-цис,13-цис-Гексадекадиеновая
Тридекановая	цис-7-Гексадекановая	7-цис,10-цис-Гексадекандиеновая
Тетрадекановая	цис-9-Гексадекановая	7-цис,10-цис,13-цис-Гексадекантриеновая
Пентадекановая	цис-9-Октадекановая	12-цис, 15-цис-Октадекадиеновая
Гексадекановая	цис-11-Октадекановая	транс-10, транс-12-Октадекадиеновая
Гептадекановая	цис-11-Ейкозановая	9-цис,12-цис,15-цис-Октадекантриеновая
Октадекановая	цис-14-Ейкозановая	6-цис,9-цис,12-цис-Октадекантриеновая
Нонадекановая	цис-13-Докозановая	9-цис,11-транс,13-транс-Октадекантриеновая
Ейкозановая	цис-15-Тетракозановая	8-транс,10-транс,12-цис-Октадекантриеновая
Генейкозановая	транс-3-Гексадекановая	6,9,12,15-Октадекатетраеновая
Докозановая	транс-9-Октадекановая	3,6,9,12-Октадекатетраеновая
Трикозановая	транс-11-Октадекановая	3,6,9,12,15-Октадекапентаеновая
Тетракозановая		14-цис,17-цис-Эйкозадиеновая
		11-цис,14-цис-Эйкозадиеновая
		8-цис,11-цис-14-цис-Эйкозадиеновая
		8-цис,11-цис-14-цис-Эйкозадиеновая
		5,8,11все-цис-Эйкозатриеновая
		5,8,11;14-все-цис-Эйкозатриеновая
		8,11,14,17-все-цис-Эйкозатетраеновая
		5,8,11,14,17-все-цис-Эйкозатетраеновая
		13,16-Докозадиеновая
		13,16,19-Докозадиеновая
		10,13,16-Докозадиеновая
		7,10,13,16-Докозадиеновая
		4,7,10,13,16-Докозадиеновая
		4,7,10,13,16,19-Докозадиеновая

Также возможны другие комбинации двойных связей или положений.

Предпочтительным липидом изобретения является, например, натуральный фосфатидилхолин, который часто называют лецитином. Она может быть получена из яиц (богатых пальмитиновой, C16:0, и олеиновой кислотой, C18:1, но также содержит стеариновую, C18:0, пальмитолеиновую, C16:1, линоленовую, C18:2, и арахидоновую кислоту, C20:4 (M, радикалы)), сои (богатой ненасыщенными цепями

C18, но также содержащей некоторые пальмитиновые радикалы, среди прочих других), кокосовых орехов (богатых насыщенными цепями), оливок (богатых мононенасыщенными цепями), шафрана (сафлор) и подсолнечника (богатого n-6 линолевой кислотой), семян льна (богатых n-3 линоленовой кислотой) и китового жира (богатого мононенасыщенными n-3 цепями), из первоцвета или примулы (богатых n-3 цепями). Предпочтительно, природные фосфатидильные этаноламины (часто называют кефалины) часто получают из яиц или сои. Предпочтительные сфингомиелины биологического происхождения обычно получают из яиц или ткани мозга. Предпочтительные фосфатидилсерины также, как правило, получают из ткани мозга, тогда как фосфатидилглицерин предпочтительно экстрагируют из бактерий, таких как E.coli, или также получают путем трансфосфатидилирования, используя фосфолипазу D, начиная с природного фосфатидилхолина. Предпочтительно используемые фосфатидилинозитолы выделяют из коммерческих соевых фосфолипидов или экстрактов печени быка. Предпочтительную фосфатидную кислоту или экстрагируют из любого из указанных выше источников или получают с использованием фосфолипазы D из пригодного фосфатидилхолина.

Кроме того, могут быть использованы синтетические фосфатидилхолины.

Количество липида в композиции составляет от около 1% до около 12%, от около 1% до около 10%, от около 1% до около 4%, от около 4% до около 7% или от около 7% до около 10% по массе. Липид может быть фосфолипидом. Фосфолипид может быть фосфатидилхолином.

Липидная композиция может не содержать алкил-лизофосфолипид. Липид в композиции может не содержать полиенеилфосфатидилхолин.

Термин "поверхностно-активное вещество" имеет его обычное значение. Перечень релевантных поверхностно-активных веществ и соответствующие определения поверхностно-активных веществ приведены в EP 0475160 A1 (см., например, стр. 6, 1.5 - стр.14, 1.17) и патенте US № 6165500 (см., например, кол. 7, 1.60 - кол. 19, 1.64), каждый из которых включен посредством ссылки во всей его полноте, и в соответствующих справочниках по поверхностно-активным веществам или фармацевтике, таких как Справочник промышленных поверхностно-активных веществ (Handbook of Industrial Surfactants) или Фармакопеи США (US Pharmacopoeia), Фармакопеи Евросоюза (Pharm. Eu). В некоторых вариантах реализации поверхностно-активными веществами являются вещества, описанные в табл. 1-18 опубликованной заявки на патент США № US 2002/0012680 A1, опубликованной 31 января 2002 г., описание которой включено посредством ссылки во всей его полноте. Поэтому приведенный далее список только предлагает выбор, который ни в коем случае не завершен или является эксклюзивным касательно нескольких классов поверхностно-активных веществ, которые являются просто общими или полезными в сочетании с настоящей патентной заявкой. Предпочтительные поверхностно-активные вещества, используемые в соответствии с описанием, включают вещества, которые имеют ГЛБ (гидрофильно-липофильный баланс) выше, чем 12. Перечень включает ионизированные жирные кислоты с длинной цепью или жирные спирты с длинной цепью, жирные длинноцепочечные аммониевые соли, такие как алкил- или алкениолтриметил-, -диметил- и -метил-аммониевые соли, алкил- или алкениол-сульфатные соли, жирные длинноцепочечные диметил- аминоксиды, такие как алкил- или алкениол-диметил-аминоксиды, жирные длинноцепочечные, например, алканоил, диметил-аминоксиды и особенно додецилдиметил-аминоксид, жирные длинноцепочечные, например, алкил-N-метилглюкамиды и алканоил-N-метилглюкамиды, такие как MEGA-8, MEGA-9 и MEGA-10, N-жирные длинноцепочечные-N,N-диметилглицины, например N-алкил- N,N-диметилглицины, 3-(жирные длинноцепочечные-диметиламмонио)-алкан-сульфонаты, например 3-(ацилдиметиламмонио)-алкансульфонаты, жирные длинноцепочечные производные сульфосукцинатных солей, такие как бис(2-этилалкил)сульфосукцинатные соли, жирные длинноцепочечные-сульфобетаины, например, ацил-сульфобетаины, жирные длинноцепочечные бетаины, такие как EMPIGEN BB или ZWITTERGENT-3-16, -3-14, -3-12, -3-10 или -3-8, или полиэтилен-гликоль-ацилфениловые простые эфиры, особенно нонаэтилен-гликоль-октил-фениловый простой эфир, полиэтилен-жирные длинноцепочечные-простые эфиры, особенно полиэтилен-ациловые простые эфиры, такие как нонаэтилен-децилоый простой эфир, нонаэтилен-додециловый простой эфир или октаэтилен-додециловый простой эфир, полиэтиленгликоль-изоациловые простые эфиры, такие как октаэтиленгликоль-изотридециловый простой эфир, полиэтиленгликоль-сорбитан-жирные длинноцепочечные сложные эфиры, например, полиэтиленгликоль-сорбитан-ациловые сложные эфиры и особенно полиоксиэтилен-монолаурат (например полисорбат 20 или Tween 20), полиоксиэтилен-сорбитан-моноолеат (например полисорбат 80 или Tween 80), полиоксиэтилен-сорбитан-монолауролеилат, полиоксиэтилен-сорбитан-монопетроселинат, полиоксиэтилен - сорбитан-моноелаидат, полиоксиэтилен - сорбитан-миристолеилат, полиоксиэтилен -сорбитан-пальмитолеинилат, полиоксиэтилен-сорбитан-петроселинат, полигидроксиэтилен-жирные длинноцепочечные простые эфиры, например, полигидроксиэтилен-ациловые простые эфиры, такие как полигидроксиэтилен-лауриловые простые эфиры, полигидроксиэтилен-миристоиловые простые эфиры, полигидроксиэтилен-цетилстеарил, полигилроксиэтилен-пальмитоиловые простые эфиры, полигидроксиэтилен-олеоиловые простые эфиры, полигидроксиэтилен-пальмитолеоиловые простые эфиры, полигидроксиэтилен-линолеил, полигидроксиэтилен-4, или 6, или 8, или 10, или 12-лауриловые, миристоиловые, пальмитоиловые, пальмитолеиловые, олеоиловые или линоеиловые простые эфиры (серии Brij), или соответствующие сложные эфиры, полигидроксиэтилен-лаурат, -миристат, -пальмитат,

-стеарат или -олеат, особенно полигидроксиэтилен-8-стеарат (Myrj 45) и полигидроксиэтилен-8-олеат, полиэтоксилированное касторовое масло 40 (Cremophor EL), сорбитан-моно жирные длинноцепочечные, например, алкилат (серии Arlacel или Span), особенно как сорбитан-монолаурат (Arlacel 20, Span 20), жирные длинноцепочечные, например, ацил-N-метилглюкамиды, алканоил-N-метилглюкамиды, особенно, деканоил-N-метилглюкамид, додеканоил-N-метилглюкамид, жирные длинноцепочечные сульфаты, например, алкил-сульфаты, алкилсульфатные соли, такие как лаурил-сульфат (SDS), олеоил-сульфат: жирные длинноцепочечные тиогликозиды, такие как алкилтиогликозиды и особенно гептил-, октил- и нонил-бета-D-тиогликопиранозид; жирные длинноцепочечные производные разных углеводов, такие как пентозы, гексозы и дисахариды, особенно алкил-гликозиды и мальтозиды, такие как гексил-, гептил-, октил-, нонил- и децил-бета-D-гликопиранозид или D-мальтопиранозид; а также соль, особенно натриевая соль холата, деоксихолата, гликохолата, гликодеоксихолата, таurодеоксихолата, таурохолата, соль жирной кислоты, особенно олеат, элаидат, линолеат, лаурат или миристат, наиболее часто в натриевой форме, лизофосфолипиды, н-октадецилен-глицерофосфатидная кислота, октадецилен-фосфорилглицерин, октадецилен-фосфорилсерин, н-жирные длинноцепочечные-глицеро-фосфатидные кислоты, такие как н-ацил-глицеро-фосфатидные кислоты, особенно лаурил-глицеро-фосфатидные кислоты, олеоил-глицеро-фосфатидная кислота, н-жирный длинноцепочечный-фосфорилглицерин, такой как н-ацил-фосфорилглицерин, особенно лаурил-, миристоил-, олеоил- или пальмитоэлоил-фосфорилглицерин, н-жирный длинноцепочечный-фосфорилсерин, такой как н-ацил-фосфорилсерин, особенно лаурил-, миристоил-, олеоил- или пальмитоэлоил-фосфорилсерин, н-тетрадецил-глицеро-фосфатидная кислота, н-тетрадецил-фосфорилглицерин, н-тетрадецил-фосфорилсерин, соответствующие элаидоил-, ваценил-лизофосфолипиды, соответствующие короткоцепочечные фосфолипиды, также как все поверхностно-активные и, таким образом, мембранодестабилизирующие полипептиды. Обычно выбирают цепочечные поверхностно-активные вещества, находящиеся в жидком состоянии или, по меньшей мере, совместимые с поддержанием в жидком состоянии цепи агрегатов носителя.

Поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в композиции в количестве от около 0,2 до 10%, от около 1% до около 10%, от около 1% до около 7% или от около 2% до 5% по массе. Неионное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтиленсорбитанов (полисорбатные поверхностно-активные вещества), полигидроксиэтиленстеаратов или полигидроксиэтиленлаурилэфиров (поверхностно-активные вещества Brij). Поверхностно-активное вещество может быть полиоксиэтилен-сорбитан-моноолеатом (например, полисорбат 80 или Tween 80) или Tween 20, 40 или 60. Полисорбат может иметь любую цепь с 12-20 атомами углерода. Полисорбат может быть жидким в композиции, и он может содержать одну или более двойных связей, быть разветвленным или содержать циклические группы.

Поверхностно-активное вещество может быть модифицировано введением молекул ПЭГ или других гидрофильных фрагментов.

Композиции изобретения могут содержать только один липид и только одно поверхностно-активное вещество в дополнение к модифицированному липиду или поверхностно-активному веществу. Альтернативно, композиции изобретения могут содержать более чем один липид и только одно поверхностно-активное вещество, например, два, три, четыре или более липидов, и одно поверхностно-активное вещество. Альтернативно, композиции изобретения могут содержать только один липид и более чем одно поверхностно-активное вещество, например, два, три, четыре или более поверхностно-активных веществ, и один липид. Композиции изобретения могут содержать более чем один липид и более чем одно поверхностно-активное вещество, например, два, три, четыре или более липидов и два, три, четыре или более поверхностно-активных веществ.

Композиции изобретения могут иметь диапазон соотношений липида к поверхностно-активному веществу (включая липид и/или поверхностно-активное вещество, связанное с АПИ). Соотношение может быть выражено в молярных показателях (моль липида/моль поверхностно-активного вещества). Молярное соотношение липида к поверхностно-активному веществу в композициях может быть от около 1:3 до около 30:1, от около 1:2 до около 30:1, от около 1:1 до около 30:1, от около 2:1 до около 20:1, от около 5:1 до около 30:1, от около 10:1 до около 30:1, от около 15:1 до около 30:1, или от около 20:1 до около 30:1. Молярное соотношение липида к поверхностно-активному веществу в композициях изобретения может быть от около 1:2 до около 10:1. Соотношение может быть от около 1:1 до около 2:1, от около 2:1 до около 3:1, от около 3:1 до около 4:1, от около 4:1 до около 5:1 или от около 5:1 до около 10:1. Молярное соотношение может быть от около 10:1 до около 30:1, от около 10:1 до около 20:1, от около 10:1 до около 25:1 и от около 20:1 до около 25:1. Соотношение липида к поверхностно-активному веществу может быть около 1,0/1,0, около 1,25/1,0, около 1,5/1,0, около 1,75/1,0, около 2,0/1,0, около 2,5/1,0, около 3,0/1,0 или около 4,0/1,0. Композиции изобретения также могут иметь изменяющиеся количества общего количества следующих компонентов: комбинация липид и поверхностно-активное вещество (ТА). Количество ТА может быть выражено в показателях массовых процентов общей композиции. ТА может быть от около 1% до около 40%, от около 5% до около 30%, от около 7,5% до около 15%, от около 6% до около 14%, от около 8% до около 12%, от около 5% до около 10%, от около 10% до около

20% или от около 20% до около 30%. ТА может быть 6%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 15% или 20%.

Выбранные интервалы общих количеств липида и соотношений липид/поверхностно-активное вещество (мол./мол.) для композиций изобретения описаны в таблице ниже.

Таблица 2. Общее количество и соотношения липида к поверхностно-активному веществу

ТА (и поверхностно-активное вещество) (%)	**Липид/Поверхностно-активное вещество (моль/моль)**
5 - 10	1,0 - 1,25
5 - 10	1,25 - 1,72
5 - 10	1,75 - 2,25
5 - 10	2,25 - 3,00
5 - 10	3,00 - 4,00
5 - 10	4,00 - 8,00
5 - 10	10,00 - 13,00
5 - 10	15,00 - 20,00
5 - 10	20,00 - 22,00
5 - 10	22,00 - 25,00
10 - 20	1,0 - 1,25
10 - 20	1,25 - 1,75
10 - 20	1,25 - 1,75
10 - 20	2,25 - 3,00
10 - 20	3,00 - 4,00
10 - 20	4,00 - 8,00
10 - 20	10,00 - 13,00
10 - 20	15,00 - 20,00
10 - 20	20,00 - 22,00
10 - 20	22,00 - 25,00

Композиции изобретения могут необязательно содержать один или более следующих ингредиентов: сорастворители, хелатирующие агенты, буферы, антиоксиданты, консерванты, бактерициды, смягчающие агенты, увлажнители, смазывающие агенты и загустители. Предпочтительные количества необязательных компонентов описаны далее.

	Молярное (М) или	Отн. мас.%*
Антиоксидант:		

Первичный:		
Бутилированный гидроксианизол, BHA		0,1-8
Бутилированный гидрокситолуол, BHT		0,1-4
Тимол		0,1-1
Метабисульфит	1-5 мМ	
Бисульфит	1-5 мМ	
Тиомочевина (MW=76,12)	1-10 мМ	
Монотиоглицерин (MW=108,16)	1-20 мМ	
Пропилгаллат (MW=212,2)		0,02-0,2
Аскорбат (MW=175,3^+ ион)	1-10 мМ	
Пальмитил-аскорбат		0,01-1
Токоферол-ПЭГ		0,5-5
Вторичный (хелатирующий агент)		
ЭДТА (MW=292)	1-10 мМ	
ЭГТА (MW=380,35)	1-10 мМ	
Десферал (MW=656,79)	0,1-5 мМ	
Буфер		
Ацетат	30-150 мМ	
Фосфат	10-50 мМ	
Триэтаноламин	30-150 мМ	

* как процент от общего количества липида

Композиции изобретения могут включать буфер для корректировки pH водного раствора в диапазоне от pH 3,5 до pH 9, от pH 4 до pH 7,5 или от pH 6 до pH 7. Примеры буферов включают, но не ограничиваются ими, ацетатные буферы, лактатные буферы, фосфатные буферы и пропионатные буферы.

Композиции изобретения обычно формируются в водной среде. Композиции могут быть сформированы с использованием или без сорастворителей, таких как низшие спирты. Композиции изобретения могут содержать, по меньшей мере, 20% по массе воды. Композиции изобретения могут содержать около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60% около 70%, около 80%, около 90% по массе воды. Композиция может содержать от около 70% до около 80% по массе воды.

"Бактерицидный" или "антимикробный" агент, как правило, прибавляют для снижения количества бактерий в фармацевтических композициях. Некоторыми примерами бактерицидных композиций являются спирты с короткой цепью, включая этиловый и изопропиловый спирт, хлорбутанол, бензиловый спирт, хлорбензиловый спирт, дихлорбензиловый спирт, гексахлорофен; фенольные соединения, такие как крезол, 4-хлор-м-крезол, п-хлор-м-ксиленол, дихлорофен, гексахлорофен, повидон-йод; парабены, особенно, алкил-парабены, такие как метил-, этил-, пропил- или бутил-парабен, бензилпарабен; кислоты, такие как сорбиновая кислота, бензойная кислота и их соли; соединения четвертичного аммония, такие как алкониевые соли, например, бромид, бензалкониевые соли, такие как хлорид или бромид, цетримониевые соли, например, бромид, феноалкециниевые соли, такие как фенододециния бромид, цетилпиридиния хлорид и другие соли; кроме того, соединения ртути, такие как ацетат, борат или нитрат фенилртути, тиомерсал, хлоргексидин или его глюконат, или любые соединении биологического происхождения, проявляющие антибиотическую активность или их любая пригодная смесь.

Примерами "антиоксидантов" являются бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT) и ди-трет-бутилфенол (LY178002, LY256548, HWA-131, BF-389, CI-986, PD-127443, E-51 или 19, BI-L-239XX, и т.д.), третичные бутилгидрохиноны (TBHQ), пропилгаллат (PG), 1-O-гексил-2,3,5-триметилгидрохинон (HTHQ); ароматические амины (фениламин, п-алкилтио-о-анизидин, производные этилендиамина, карбазол, тетрагидроинденидол); фенолы и фенольные кислоты (гваякол, гидрохинон, ванилин, галловые кислоты и их сложные эфиры, протокатеховая кислота, хинная кислота, сиреневая кислота, эллаговая кислота, салициловая кислота, нордигидрогвайаретовая кислоты (NDGA), эвгенол); токоферолы (включая токоферолы (альфа, бета, гамма, дельта)) и их производные, такие как

токоферил-ацилат (например, -ацетат, -лаурат, -миристат, -пальмитат, -олеат, -линолеат и т.д., или другой пригодный токоферил-липоат), токоферил-ПОЭ-сукцинат; тролокс и соответствующий амидный и тиокарбоксамидный аналоги; аскорбиновая кислота и ее соли, изоаскорбат, (2, или 3, или 6)-о-алкиласкорбиновые кислоты, сложные эфиры аскорбила (например, 6-о-лауроил, миристоил, пальмитоил, олеоил или линолеоил-L-аскорбиновая кислота и т.д.). Также полезными являются предпочтительно окисленные соединения, такие как бисульфит натрия, метабисульфит натрия, тиомочевина; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, GDTA, десферал, разные эндогенные защитные системы, такие как трансферрин, лактоферрин, ферритин, керулоплазмин, гаптоглобион, геаморексин, альбумин, глюкоза, убихинол-10); ферментные антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза и металлические комплексы с аналогичной активностью, включая каталазу, глутатионпероксидазу и менее сложные молекулы, такие как бета-каротин, билирубин, мочевая кислота; флавоноиды (флавоны, флавонолы, флавононы, флаванонолы, хальконы, антоцианины), N-ацетилцистеин, месна, глутатион, производные тиогистидина, триазолы; танины, коричная кислота, гидроксикоричные кислоты и их сложные эфиры (кумаровые кислоты и сложные эфиры, кофейная кислота и ее сложные эфиры, феруловая кислота, (изо)хлорогеновая кислота, синаповая кислота); экстракты специй (например, из гвоздики, корицы, шалфея, розмарина, мускатного ореха, душистого перца, мускатного ореха); кариозная кислота, карнозол, карсоловая кислота; розмариновая кислота, розмаридифенол, гентизиновая кислота, феруловая кислота; экстракты из овсяной крупы, такие как авенантрамид 1 и 2; тиоэфиры, дитиоэфиры, сульфоксиды, тетраалкилтиурамдисульфиды; фитиновая кислота, стероидные производные (например, U74006F); метаболиты триптофана (например, 3-гидроксикинуренин, 3-гидроксиантраниловая кислота) и органохалкогениды.

"Загустители" используются для увеличения вязкости фармацевтических композиций и могут быть выбраны из фармацевтически приемлемых гидрофильных полимеров, таких как частично этерифицированные производные целлюлозы, включая карбоксиметил-, гидроксиэтил-, гидроксипропил-, гидроксипропилметил- или метил-целлюлозу; полностью синтетических гидрофильных полимеров, включающих полиакрилаты, полиметакрилаты, поли(гидроксиэтил)-, поли(гидроксипропил)-, поли(гидроксипропилметил)метакрилат, полиакрилонитрил, металлил-сульфонат, полиэтилены, полиоксиэтилены, полиэтиленгликоли, полиэтиленгликоль-лактид, полиэтиленгликоль-диакрилат, поливинилпирролидон, поливиниловые спирты, поли(пропилметакриламид), поли(пропиленфумарат-ко-этиленгликоль), полоксамеры, полиаспартамид, (поперечно связанная гидразином)гиалуроновая кислота, силикон; природные смолы содержащие альгинаты, каррагинан, гуаровая смола, желатин, трагакант, (амидированный) пектин, ксантан, хитозан, коллаген, агароза; их смеси и дополнительные производные или сополимеры и/или другие фармацевтически, или, по меньшей мере, биологически приемлемые полимеры.

Композиции настоящего изобретения также могут содержать полярную жидкую среду. Композиции изобретения могут быть введены в водной среде. Композиции настоящего изобретения могут быть в форме раствора, суспензии, эмульсии, крема, лосьона, мази, геля, спрея, пленкообразующего раствора или лака.

Не ограничиваясь каким-либо механизмом действия или какой-либо теорией, композиции настоящего изобретения могут образовывать везикулы или АУП (агрегаты с увеличенной поверхностью), характеризующиеся адаптируемостью, способностью к деформации или способностью к проникновению. Похожие везикулы (без связанного терапевтического начала) описаны и в WO 2010/140061, и в WO 2011/022707.

Композиции изобретения полезны в предотвращении или лечении различных заболеваний или состояний, в зависимости от АПИ, как упоминалось выше.

Например, везикулярные композиции изобретения могут содержать один, два или три из витаминов D_3, C, E или B_7. Композиция может быть использована отдельно или в качестве компонента или ингредиента более сложного продукта по уходу за кожей, такого как солнцезащитный продукт, продукт против загара, увлажнитель, сыворотка или в косметических средствах. Композиция или конечный продукт по уходу за кожей может быть в виде крема, геля, лосьона, мусса или спрея.

Предложенным изобретением является везикулярная композиция для применения, как определено выше, в которой питательным микроэлементом является витамин D_3, композиция может быть включена в солнцезащитный продукт, продукт против загара, продукт после загара или другой продукт по уходу за кожей или косметический продукт для восполнения низкого уровня витамина D; в которой питательным микроэлементом является витамин C или витамин E, композиция может быть включена в солнцезащитный продукт, продукт против загара, продукт после загара или другой продукт по уходу за кожей или косметический продукт для восполнения эпидермального и кожного витамина C или витамина E и оказания помощи в предотвращении или восстановлении кожи поврежденной солнцем или стареющей кожи; в которой питательным микроэлементом является витамин B_7, композиция может быть включена в солнцезащитный продукт, продукт против загара, продукт после загара или другой продукт по уходу за кожей или косметический продукт для снижения или устранения дерматозов, связанных с отсутствием этого питательного микроэлемента.

Везикулярная композиция изобретения может быть представлена в форме ранозаживляющего продукта, который наносится местно. Таким образом, изобретение предлагает композицию первого аспекта

для применения в лечении ран кожи, в которой АПИ является аскорбиновой кислотой (витамин С).

Изобретение описано ниже со ссылкой на следующие неограничивающие примеры и чертежи, на которых:

фиг. 1 иллюстрирует график концентрации арахидонового субстрата от скорости реакции для везикул с привязанным напроксеном или диклофенаком;

фиг. 2 иллюстрирует обратный график (Лайнуивера-Бурка) к графику с фиг. 1;

фиг. 3 иллюстрирует график концентрации арахидонового субстрата от скорости реакции для везикул с привязанным напроксеном или диклофенаком после исследования ПНМ; и

фиг. 4 иллюстрирует обратный график (Лайнуивера-Бурка) к графику с фиг. 3.

Примеры композиций

Примеры везикулярных композиций

Пример композиции 1.

Композиция 1 содержит сфингомиелин (мозг) (47,944 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (42,05 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, лактатный буфер (pH 4), бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (30,000 мг/г).

Пример композиции 2.

Композиция 2 содержит сфингомиелин (мозг) (53,750 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (31,250 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, лактатный буфер (pH 4), бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (15,000 мг/г).

Пример композиции 3.

Композиция 3 содержит сфингомиелин (мозг) (90,561 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (79,439 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, лактатный буфер (pH 4), бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (30,000 мг/г).

Пример композиции 4.

Композиция 4 содержит фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (8,500 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 7,5), BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (1,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (36,51 мг/г).

Пример композиции 5.

Композиция 5 содержит фосфатидилхолин (71,460 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (4,720 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 7,8), BHA (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, глицерин (15,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (35,000 мг/г).

Пример композиции 6.

Композиция 6 содержит фосфатидилхолин (71,460 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (4,720 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 7,8), BHA (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, глицерин (50,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (15,000 мг/г).

Пример композиции 7.

Композиция 8 содержит фосфатидилхолин (71,4600 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (4,720 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 7,5), BHA (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, глицерин (50,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (35,000 мг/г).

Пример композиции 8.

Композиция 8 содержит фосфатидилхолин (64,516 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (35,484 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 6,7), BHA (0,200 мг/г) в качестве антиоксиданта, бензиловый спирт или парабен (4,200 мг/г) в качестве антимикробного агента, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (30,000 мг/г).

Пример композиции 9.

Фосфатидилхолин (64,516 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (35,484 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 6,7), BHA (0,200 мг/г) в качестве антиоксиданта, бензиловый спирт (5,250 мг/г) или парабен (4,200 мг/г) в качестве растворителя, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (30,000 мг/г).

Пример композиции 10.

Фосфатидилхолин (71,460 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (4,720 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, фосфатный буфер (pH 6,7), BHA (0,200 мг/г) в качестве антиоксиданта, бензиловый спирт или парабен (10,000 мг/г) в качестве антиоксиданта, глицерин (50,000 мг/г), ЭДТА (3,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (30,000 мг/г).

Пример везикулярных композиций с присоединенным АПИ.

Пример композиции 11.

Композиция 9 содержит фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (8,500 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, коллагенилфосфатидилхолин (1 мг/г) в качестве АПИ, фосфатный буфер (pH 7,5), BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (1,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (36,51 мг/г).

Пример композиции 12.

Композиция 10 содержит фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (8,500 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, коллагенилфосфатидилхолин (0,5 мг/г) в качестве АПИ, фосфатный буфер (pH 7,5), BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (1,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (36,51 мг/г).

Пример композиции 13.

Композиция 11 содержит фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (8,500 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, коллагенил Tween (0,5 мг/г), фосфатный буфер (pH 7,5), BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, бензиловый спирт или парабен (5,000 мг/г) в качестве антимикробного агента, глицерин (30,000 мг/г), ЭДТА (1,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (36,51 мг/г).

Пример 14 и его изготовление и тестирование.

Композиция 14 содержит фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (6,800 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, аскорбилпальмитат (0,530 мг/г) в качестве АПИ, цитратно-фосфатный буфер (pH 5,4), BHT (0,200 мг/г) и метабисульфит натрия (0,500 мг/г) в качестве антиоксидантов, ЭДТА (1,000 мг/г) в качестве хелатирующего агента и этанол (48,87 мг/г).

Краткое описание

Успешно получали композицию трансферсомы, содержащую ковалентно связанную аскорбиновую кислоту с 20% молярным замещением полисорбата 80. Результаты исследований показали, что распределение размеров, характеристики деформируемости и заряд трансферсом не были затронуты включением аскорбиновой кислоты, так что сложный эфир L-аскорбилпальмитат был доступен ферменту карбоксилэстеразе на внешней поверхности трансферсомы, так что трансферсомы аскорбилпальмитата были активны в исследовании по снижению уровня Fe^{3+}, и что они сохраняли свою активность по снижению уровня после деформации для того, чтобы пройти через поры, которые были меньше, чем их средний размер.

Изготовление

Получали трансферсомы, используя соевый фосфатидилхолин (Lipoid SPC S-100) и полисорбат 80, содержащий L-аскорбилпальмитат (Sigma 7618). Также получали контрольную партию трансферсом. Бутилгидрокситолуол, ЭДТА и метабисульфит натрия добавляли в трансферсомам для минимизации окисления L-аскорбилпальмитата.

Получение трансфертом L-аскорбилпальмитата

Получали 50 г партию трансферсом L-аскорбилпальмитата, используя молярные соотношения соевый фосфатидилхолин:полисорбат 80:L-аскорбилпальмитат 13,3:0,8:0,2.

Используя осторожное нагревание и перемешивание, соевый фосфатидилхолин (3,44 г), полисорбат 80 (0,34 г), бутилгидрокситолуол (0,01 г) и L-аскорбилпальмитат (0,0265 г) растворяли в этаноле с получением общей массы 6,26 г.

25 мМ цитратно-фосфатный буфер pH 5,4, с 0,1% ЭДТА и 0,05% метабисульфита натрия, (43,74 г) интенсивно перемешивали при 35°C и в это время из шприца, оснащенного широкой иглой, добавляли композицию соевого фосфатидилхолина. Смесь перемешивали около 15 мин.

Трансферсомы получали путем экструзии через 0,2 мкм фильтр, затем через 0,1 мкм фильтр и затем через 0,1 мкм фильтр, используя фильтровальную систему Sartorius 47 мм при 35°C с давлением азота 4 бар. Каждый фильтр имел сверху стекловолоконный фильтр предварительной очистки. Трансферсомы хранили в темноте при +5°C.

Получение контрольных трансферсом

Получали 50 г партию контрольных трансферсом, используя молярное соотношение соевый фосфатидилхолин:полисорбат 80 13,3:1.

Используя осторожное нагревание и перемешивание, соевый фосфатидилхолин (3,44 г), полисорбат 80 (0,425 г) и бутилгидрокситолуол (0,01 г) растворяли в этаноле с получением общей массы 6,26 г.

25 мМ цитратно-фосфатный буфер pH 5,4, с 0,1% ЭДТА и 0,05% метабисульфита натрия, (43,74 г)

интенсивно перемешивали при 35°C и в это время из шприца, оснащенного широкой иглой, добавляли композицию соевого фосфатидилхолина. Смесь перемешивали около 15 мин.

Контрольные трансферсомы экструдировали, как описано для партии трансферсом L-аскорбилпальмитата PD-14-0035. Трансферсомы хранили в темноте при +5°C.

Аналитические методы

Измерение размера частиц

Определяли средний размер частиц и распределение частиц по размерам для композиций трансферсом методом динамического светорассеяния, используя фотонно-корреляционный спектрометр. Когда когерентный свет проходит через суспензию частиц, свет рассеивается во всех направлениях. Измерением и корреляцией интенсивности рассеянного света суспензии частиц можно определить распределение размеров и размер частиц в суспензии.

Определяли средний размер частиц и распределение по размерам частиц для каждого образца с использованием фотонно-корреляционного спектрометра ALV-5000/E. Образцы разводили деионизированной водой с получением детектируемого сигнала в диапазоне 50-500 кГц и затем анализировали, используя более шести измерений, каждое длительностью 30 с. Температуру поддерживали на уровне 25°C. Данные подвергали анализу регуляризированной кумулятивной подгонки второго порядка для получения среднего размера частиц (приводится как r или средний радиус), а также распределение размеров частиц для образца (приводится как w или ширина). Средний радиус умножали на 2 с получением среднего диаметра (нм).

Рассчитывали индекс полидисперсности (ИПД) для каждого образца согласно следующему уравнению:

$$ИПД = \left(\frac{w}{r}\right)^2$$

где

w = ширина и

r = средний радиус.

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны (ПНМ) использует приложенное давление, чтобы получить энергию активации трансферсом, обеспечивающую ей деформацию и прохождение через поры фильтра, которые меньше, чем средний размер трансферсом.

Мембранный фильтр Anodisc 13 (размер пор 20 нм) устанавливали на фильтрационной опоре в основе фильтрующего устройства и сверху присоединяли бак из нержавеющей стали. 3 мл образец трансферсом, предварительно уравновешенный при 25°C, помещали в бак и вокруг него обматывали теплопередающую трубку, соединенную с термоциркулятором (25°C). К баку присоединяли трубку под давлением, соединенную с азотным баллоном. Используя серию клапанов, в системе создавали давление 9,5 бар с получением начального давления 7,5 бар. Устройство фильтрации помещали на накопительную емкость, расположенную на точно взвешиваемых весах, которые были подключены к компьютерной программе Excel. Контроллер давления Бронкхурст использовали для управления и мониторинга давления и когда система клапанов была открыта и время запущено, регистрировали увеличение массы фильтрата трансферсом на весах от снижения давления и увеличения времени.

Оценивали данные времени, давления, массы в программе MathCAD для определения значения P*. P* представляет собой меру активации давления необходимого для проникновения через поры и, следовательно, меру жесткости и деформируемости мембраны трансферсомы. Средний размер частиц трансферсом измеряли с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии до и после фильтрации ПНМ.

Исследование аскорбиновой кислоты

Измеряли концентрации аскорбилпальмитата и аскорбиновой кислоты, используя набор для исследования аскорбиновой кислоты (Abcam ab65656). В этом исследовании, Fe^{3+} восстанавливается до Fe^{2+} в присутствии антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота. Fe^{2+} хелатируется с колориметрическим зондом с образованием продукта с абсорбцией при 593 нм.

Для определения общей концентрации аскорбилпальмитата, трансферсомы солюбилизировали путем разбавления 1:7:2 об./об. этанолом и 5% Triton X-100. Получали стандартную кривую аскорбилпальмитата с помощью первоначального разбавления в этаноле до концентрации в диапазоне от 0,0125 до 0,25 мМ, затем дополнительно разбавляли 7:1:2 об./об. в воде и 5% Triton X-100 до конечной концентрации в диапазоне от 0 01 до 0,175 мМ. Включали 0 мМ аскорбилпальмитатную пустышку. Стандарты и образцы загружали на микротитровальный планшет и смешивали 1:1 об./об. с реакционной смесью, содержащей буфер набора, Fe^{3+} и колориметрический зонд. После 1 мин инкубации при комнатной температуре планшет считывали при 593 нм. 0 мМ аскорбилпальмитатную пустышку вычитали из всех стандартов и образцов и поглощение для контрольных "пустых" трансферсом отнимали от аскорбилпальмитатных трансферсом. Конечное поглощение сравнивали со стандартной кривой аскорбилпальмитата с получением общей концентрации аскорбилпальмитата (аскорбиновой кислоты) (мМ).

Для определения внешней концентрации аскорбиновой кислоты, получали стандартную кривую ас-

корбиновой кислоты путем разбавления аскорбиновой кислоты водой до диапазона концентраций от 0,025 до 0,2 мМ. Стандарты и образцы трансферсом наносили на микротитровальный планшет и смешивали 1:1 об./об. с реакционной смесью, содержащей буфер набора, Fe^{3+} и колориметрический зонд. После 1 мин инкубации при комнатной температуре планшет считывали при 593 нм. Пустой планшет отнимали от всех стандартов и образцов, а поглощение для контрольных "пустых" трансферсом отнимали от аскорбилпальмитатных трансферсом. Конечное поглощение сравнивали со стандартной кривой аскорбиновой кислоты с получением общей концентрации аскорбиновой кислоты. Концентрацию сравнивали с общей концентрацией аскорбилпальмитата (аскорбиновая кислота) для расчета % аскорбиновой кислоты, прикрепленной к внешней поверхности аскорбилпальмитатных трансферсом.

Расщепление карбоксилэстеразой и ОФ-ВЭЖХ

Высвобождение аскорбиновой кислоты из трансферсом, содержащих аскорбилпальмитат, проводили путем ферментного расщепления сложного эфира используя изоформу B карбоксилэстеразы 1 (Sigma E0287). Добавляли 960 единиц фермента на мл трансферсом, перед инкубацией при температуре +37°C. Отбирали образцы на 2 и 4 часу и высвобожденную аскорбиновую кислоту экстрагировали добавлением 1 объема ацетонитрил/метанол/муравьиная кислота (80 об./20 об./0,2 об.) с последующей обработкой ультразвуком в течение 5 мин и центрифугированием с осаждением нерастворимых компонентов. Образцы надосадочной жидкости затем фильтровали через мембрану 0,2 мкм и затем разбавляли 1 к 10 водой ультравысокой чистоты.

Образцы анализировали с помощью обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с использованием колонки Luna C18(2) 100A 5 мкм 4,6×250 мм и модуля разделения Waters 2695 при +25°C и градиента согласно таблице ниже, где в качестве элюента A был 20 мМ фосфат калия pH 3,0 и элюентом B был ацетонитрил. Обнаружение проводили при длине волны 260 нм с использованием детектора Waters 2487.

Время (минуты)	**Поток (мл/мин)**	**% Элюент A**	**% Элюент B**
0	1	95	5
10	1	87	13
11	1	35	65
15	1	35	65
16	1	95	5
25	1	95	5

Кроме того, была проанализирована стандартная кривая аскорбиновой кислоты в диапазоне от 0,4 до 100 мкг/мл, используя тот же самый способ ОФ-ВЭЖХ. Пик аскорбиновой кислоты был интегрирован в полученные хроматограммы для образцов и стандартов. Анализировали площади пиков стандартов с линейной регрессией для получения уравнения для стандартной кривой. Площади пиков образцов затем использовали для определения концентрации аскорбиновой кислоты из уравнения для стандартной кривой с учетом разведения от способа экстракции. Концентрацию сравнивали с общей концентрацией аскорбиновой кислоты для расчета % аскорбиновой кислоты, высвобождаемой с внешней поверхности аскорбилпальмитатных трансферсом.

Электрофорез на бумаге

Исследовали характеристики зарядов композиций трансферсом с помощью электрофореза на бумаге, где полоски бумаги подвешивали между двумя резервуарами наполненными буферами, тестируемый образец наносили на полоску и к полоске прикладывали электрический ток. Заряженные частицы мигрировали вдоль полоски, из направления и расстояния движения определяли чистый заряд частиц в pH буфере.

Каждый исследуемый образец наносили в объеме (100 мкл) по центру отдельных 2×20 см полосок фильтровальной бумаги Ватмана (предварительно смоченных рабочим буфером; 2,3 мг/мл хлорида натрия, 1,5 мг/мл хлорида кальция, 1,3 мг/мл глицилглицина, 25 мг/мл маннита, 10 мг/мл сахарозы и 0,5 мг/мл метионина pH 5,75) и исследовали при 130 В в течение 2 ч. Каждую полосу окрашивали ПЭГ (компонент полисорбата 80) с 5% мас./об. хлорида бария и 0,05 М йода и затем сушили. Измеряли расстояние движения трансферсом от центральной точки для каждого образца для анодной и катодной сторон полоски, чтобы определить суммарный заряд везикулы.

Результаты и обсуждения

Результаты сведены в табл. 4. Стерильно фильтровали образцы аскорбилпальмитатных трансферсом 0,2 мкм и повторно исследовали после фильтрации для того, чтобы проверить целостность образцов для информации.

Таблица 4. Анализ контрольных и аскорбилпальмитатных трансферсом

Тест	**Контрольные трансферсомы**	**Аскорбил-пальмитатные трансферсомы**	**Аскорбил-пальмитатные трансферсомы после 0,2 мкм фильтрации**	**Аскорбил-пальмитатные трансферсомы после ПНМ исследования**
Фотонно-корреляционная спектрометрия%:				
Средний диаметр частиц (нм)	138,64	141,32	140,90	74,26
Индекс полидисперсности	0,050	0,063	0,062	0,127
Исследование ПНМ:				
Восстановление после фильтрации %	20,3	13,3	Н/С	Н/С
Деформируемость P*	1,622	1,698	Н/С	Н/С
Исследование аскорбиновой				

кислоты:				
Общая концентрация аскорбилпальмитата	Н/С	0,61 мМ / 253 мкг/мл	0,67 мМ / 278 мкг/мл	0,79 мМ / 327 мкг/мл
Общая концентрация аскорбиновой кислоты (АК)	Н/С	0,61 мМ / 107 мкг/мл	0,67 мМ / 118 мкг/мл	0,79 мМ / 139 мкг/мл
Концентрация внешней АК	Н/С	0,13 мМ / 23 мкг/мл	0,12 мМ / 21 мкг/мл	0,14 мМ / 25 мкг/мл
% Внешней АК	Н/С	21%	18%	18%
Расщепление карбоксилэстеразой / ВЭЖХ:				
Концентрация высвобожденной внешней АК (2 часа 37°С)	Н/С	16 мкг/мл (15%)	Н/С	13 мкг/мл (9%)
Концентрация высвобожденной внешней АК (4 часа 37°С)	Н/С	38 мкг/мл (36%)	Н/С	26 мкг/мл (19%)
Электрофорез на бумаге	Чистый положительный заряд	Чистый положительный заряд	Н/С	Н/С

Н/С - нет сведений

Измерение размера частицы

Средний диаметр частиц и индекс полидисперсности были похожи у контрольных трансферсом и у тех, которые содержат аскорбилпальмитат. Это означает, что 20% замещение полисорбата 80 сложным эфиром в трансферсомах не влияло на характеристики размера. Отсутствовали какие-либо существенные изменения в размере после 0,2 мкм стерильной фильтрации.

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны

Значение деформируемости P* было практически одинаковым для трансферсом, содержащих аскорбилпальмитат и контрольных трансферсом, что указывает на то, что 20% замещение полисорбата 80 сложным эфиром не имеет существенного влияния на свойства деформируемости трансферсом. Процент восстановления после фильтрования был немного выше у контрольных трансферсом, что может свидетельствовать о том, что включение аскорбилпальмитата имеет очень слабое влияние на жесткость мембраны везикулы.

Средний диаметр частиц после ПНМ фильтрации уменьшался почти на 50% по сравнению с предварительной фильтрацией и для контрольных трансферсом, и для трансферсом, содержащих аскорбилпальмитатный сложный эфир. Индекс полидисперсности была немного выше, что свидетельствует о более широком распределении по размерам. Эти характеристики являлись ожидаемыми для трансферсомных везикул.

Исследование аскорбиновой кислоты

Определяли общую концентрацию аскорбилпальмитата в аскорбилпальмитатных трансферсомах как 0,61 мМ. Это приравнивается к 253 мкг/мл аскорбилпальмитата или 107 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Концентрация была около 50% от той, что была в начале производственного процесса, что указывает на произошедшие потери, возможно за счет комбинации фильтрования и окисления аскорбиновой кислоты. Тем не менее, результаты показали, что активная аскорбиновая кислота способна снизить Fe^{3+}, присутствующий в конечной композиции трансферсомы.

Определяли концентрацию аскорбиновой кислоты, которая вступает в реакцию на внешней поверхности аскорбилпальмитатных трансферсом, как 0,13 мМ. Это соответствует 23 мкг/мл или 21% от общей

концентрации аскорбиновой кислоты, которая была присоединена к внешней поверхности.

Отсутствовали какие-либо существенные изменения концентрации общей или внешней аскорбиновой кислоты после 0,2 мкм стерильной фильтрации.

Общая концентрация аскорбилпальмитата в трансферсомах, которые были подвергнуты исследованию приспособляемости непрерывной мембраны (ПНМ), была немного выше, чем до ПНМ. Концентрация внешней аскорбиновой кислоты была практически такой же в до/после-ПНМ. Это означает, что трансферсомы, которые деформировались при прохождении через поры, размер которых был меньше, чем их средний диаметр, вообще не теряют свою активность к восстановлению.

Расщепление карбоксилэстеразой и ОФ-ВЭЖХ

Инкубация трансферсом, содержащих аскорбилпальмитатный сложный эфир с ферментом карбоксилэстеразой 1, привело к высвобождению 15% (16 мкг/мл) от общего количества аскорбиновой кислоты после 2 ч инкубации при 37°C и 36% (38 мкг/мл) после 4 ч при 37°C. Аскорбиновая кислота, которая была прикреплена к внешней поверхности трансферсомы, была доступна для фермента. Концентрации, полученные для внешней аскорбиновой кислоты, были аналогичными полученным в анализе аскорбиновой кислоты.

Трансферсомы, которые были подвергнуты исследованию деформируемой фильтрации ПНМ, также инкубировали с ферментом карбоксилэстеразой 1, что приводит к высвобождению 9% (13 мкг/мл) от общего количества аскорбиновой кислоты после 2 ч инкубации при 37°C и 19% (26 мкг/мл) после 4 ч при температуре 37°C. Непонятно, почему процент высвобождения был ниже после ПНМ, но, возможно, изменение размера везикулы уменьшило доступность аскорбилпальмитата ферменту.

Электрофорез на бумаге

И контрольные трансферсомы, и трансферсомы, содержащие аскорбилпальмитат, мигрировали к катоду в аппарате для электрофореза, демонстрируя чистый положительный заряд. Следовательно, наличие аскорбилпальмитата не изменяет характеристики заряда трансферсом.

Пример композиции 15 и ее получение и исследование

Композиция 15 содержит или фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (7,66 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, пальмитоилтрипептид 1 (0,370 мг/г) в качестве АПИ, фосфатный буфер (pH 7,7) и этанол (48,10 мг/г) или фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (7,66 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, пальмитоилтетрапептид 7 (0,450 мг/г) в качестве АПИ, фосфатный буфер (pH 7,7) и этанол (48,40 мг/г).

Краткое описание

Успешно получали композиции трансферсом, содержащие ковалентно связанные пептиды; тетрапептид-7 и трипептид-1; с 10% молярным замещением полисорбата 80. Результаты исследований показали, что распределение размеров, характеристики деформируемости и заряд трансферсом не были затронуты включением пептидов.

Изготовление

Получали трансферсомы, используя соевый фосфатидилхолин (Lipoid SPC S-100) и полисорбат 80, содержащие или пальмитоилтетрапептид-7 (PAL-GQPR), или пальмитоилтрипептид-1 (PAL-GHK) (Sinoway Industrial Co. Ltd). Также получали контрольную партию трансферсом.

Получение пальмитоилпептидных трансфертом

Получали 50 г партию пальмитоилтетрапептид-7 трансферсом и 50 г партию пальмитоилтрипептид-1 трансферсом, используя молярные соотношения фосфатидилхолин:полисорбат 80:пальмитоилпептид 13,3:0,9:0,1

Используя осторожное нагревание и перемешивание, соевый фосфатидилхолин (3,44 г), полисорбат 80 (0,383 г) и или пальмитоилтетрапептид-7 (0,0224 г), или пальмитоилтрипептид-1 (0,0186 г) растворяли в этаноле с получением общей массы 6,26 г.

Фосфатный буфер pH 7,7 (43,74 г) интенсивно перемешивали при 35°C и в это время из шприца, оснащенного широкой иглой, добавляли композицию соевого фосфатидилхолина. Смесь перемешивали около 15 мин.

Трансферсомы получали путем экструзии через 0,2 мкм фильтр, затем через 0,1 мкм фильтр и затем через 0,1 мкм фильтр, используя фильтровальную систему Sartorius 47 мм при 35°C с давлением азота 4 бар. Каждый фильтр имел сверху стекловолоконный фильтр предварительной очистки. Трансферсомы хранили в темноте при +5°C.

Получение контрольных трансферсом

Получали 50 г партию контрольных трансферсом используя молярное соотношение соевого фосфатидилхолина:полисорбат 80 13,3:1.

Используя осторожное нагревание и перемешивание, соевый фосфатидилхолин (3,44 г) и полисорбат 80 (0,425 г) растворяли в этаноле с получением общей массы 6,26 г.

Фосфатный буфер pH 7,7 (43,74 г) интенсивно перемешивали при 35°C и в это время из шприца, оснащенного широкой иглой, добавляли композицию соевого фосфатидилхолина. Смесь перемешивали около 15 мин.

Контрольные трансферсомы экструдировали, как описано для партий пальмитоилпептидных

трансферсом. Трансферсомы хранили в темноте при +5°C.

Аналитические методы измерения размера частиц

Определяли средний размер частиц и распределение частиц по размерам для композиций трансферсом методом динамического светорассеяния, используя фотонно-корреляционный спектрометр. Когда когерентный свет проходит через суспензию частиц, свет рассеивается во всех направлениях. Измерением и корреляцией интенсивности рассеянного света суспензии частиц можно определить распределение размеров и размер частиц в суспензии.

Определяли средний размер частиц и распределение по размерам частиц для каждого образца с использованием фотонно-корреляционного спектрометра ALV-5000/E. Образцы разводили деионизированной водой с получением детектируемого сигнала в диапазоне 50-500 кГц и затем анализировали, используя более шести измерений, каждое длительностью 30 с. Температуру поддерживали на уровне 25°C. Данные подвергали анализу регуляризированной кумулятивной подгонки второго порядка для получения среднего размера частиц (приводится как r или средний радиус), а также распределение размеров частиц для образца (приводится как w или ширина). Средний радиус умножали на 2 с получением среднего диаметра (нм).

Рассчитывали индекс полидисперсности (ИПД) для каждого образца согласно следующему уравнению:

$$ИПД = \left(\frac{w}{r}\right)^2$$

где

w = ширина и

r = средний радиус.

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны (ПНМ) использует приложенное давление, чтобы получить энергию активации трансферсом, обеспечивающую ей деформацию и прохождение через поры фильтра, которые меньше, чем средний размер трансферсом.

Мембранный фильтр Anodisc 13 (размер пор 20 нм) устанавливали на фильтрационной опоре в основе фильтрующего устройства и сверху присоединяли бак из нержавеющей стали. 3 мл образец трансферсом, предварительно уравновешенной при 25°C, помещали в бак и вокруг него обматывали теплопередающую трубку, соединенную с термоциркулятором (25°C). К баку присоединяли трубку под давлением, соединенную с азотным баллоном. Используя серию клапанов, в системе создавали давление 9,5 бар с получением начального давления 7,5 бар. Устройство фильтрации помещали на накопительную емкость, расположенную на точно взвешиваемых весах, которые были подключены к компьютерной программе Excel. Контроллер давления Бронкхурст использовали для управления и мониторинга давления и когда система клапанов была открыта и время запущено, регистрировали увеличение массы фильтрата трансферсом на весах от снижения давления и увеличения времени.

Оценивали данные времени, давления, массы в программе MathCAD для определения значения P*. P* представляет собой меру активации давления необходимого для проникновения через поры и, следовательно, меру жесткости мембраны трансферсомы. Средний размер частиц трансферсом измеряли с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии до и после фильтрации ПНМ.

Исследование концентрации пептида (CBQCA)

Измеряли концентрацию пептидной части пальмитоилтрипептид-1, используя аминокислотную последовательность глицин-гистидин-лизин путем модифицирования первичной аминогруппы аминокислоты лизина с помощью реагента 3-(4-карбоксибензоил)хинолон-2-карбоксальдегида (CBQCA), с получением флуоресцентного продукта.

Образцы пальмитоилтрипептид-1 трансферсом и контрольных трансферсом разводили в диапазоне от 1 к 400 до 1 к 3200 в 0,1 мМ буфере бората натрия pH 9,3. Поскольку не было возможности солюбилизироать пальмитоилтрипептид 1 в водной среде, подходящей для этого анализа, определение концентрации трипептида 1 в трансферсомах было сделано относительно стандартной кривой бычьего сывороточного альбумина (БСА). Получали БСА с известной концентрацией в диапазоне от 6,7 мкг/мл до 0,33 мг/мл. Проводили модификацию первичных аминов стандартов и образцов в формате микропланшетов при комнатной температуре, используя реагент CBQCA в присутствии цианида калия в течение 1 ч. Проводили измерения путем считывания на флуориметре BMG Fluostar Optima с длиной волны возбуждения 485 нм и длинной волны флуоресценции излучения 520 нм.

Считанное значение флуоресценции пустого образца 0,1 мМ буфера бората натрия pH 9,3 отнимали от всех данных. Анализировали полученные данные флуоресценции стандартов БСА с помощью линейной регрессии с получением уравнения для стандартной кривой. Затем определяли количество пептида в пальмитоилтрипептид-1 трансферсомах относительно кривой БСА после отнимания флуоресценции контрольных трансферсом с эквивалентным разведением.

Электрофорез на бумаге

Исследовали характеристики зарядов композиций трансферсом с помощью электрофореза на бума-

ге, где полоски бумаги подвешивали между двумя резервуарами наполненными буферами, тестируемый образец наносили на полоску и к полоске прикладывали электрический ток. Заряженные частицы мигрировали вдоль полоски, из направления и расстояния движения определяли чистый заряд частиц в pH буфере.

Каждый исследуемый образец наносили в объеме (100 мкл) по центру отдельных 2×20 см полосок фильтровальной бумаги Ватмана (предварительно смоченных рабочим буфером; 2,3 мг/мл хлорида натрия, 1,5 мг/мл хлорида кальция, 1,3 мг/мл глицилглицина, 25 мг/мл маннита, 10 мг/мл сахарозы и 0,5 мг/мл метионина pH 5,75) и исследовали при 130 В в течение 2 ч. Каждую полосу окрашивали ПЭГ (компонент полисорбата 80) с 5% мас./об. хлорида бария и 0,05 М йода и затем сушили. Измеряли расстояние движения трансферсом от центральной точки для каждого образца для анодной и катодной сторон полоски, чтобы определить суммарный заряд везикулы.

Результаты и обсуждения

Результаты сведены в табл. 5.

Таблица 5. Анализ пальмитоилпептидной трансферсомы

Тест	**Партия**		
	Контрольные трансферсомы	**Пальмитоил-тетрапептид 7 трансферсомы**	**Пальмитоил-трипептид 1 рансферсомы**
Фотонно-корреляционная спектрометрия%:			
Средний диаметр частиц (нм)	142,70	142,84	141,12
Индекс полидисперсности	0,071	0,053	0,062
Исследование ПНМ:			
Восстановление после фильтрации %	14,7	14,3	14,0

Деформируемость P*	1,725	1,595	1,759
Средний диаметр частиц после ПНМ (нм)	74,3	72,28	74,68
Индекс полидисперсности после ПНМ	0,11	0,12	0,099
Теоретическая концентрация пептида	0 мМ / 0 мкг/мл	0,65 мМ / 296 мкг/мл	0,65 мМ / 221 мкг/мл
Концентрация пептида (исследование CBQCA)	Н/С	Не определяется вследствие отсутствия первичных аминов в пептиде	Определяемый пептид (424 мкг/мл)
Электрофорез на бумаге	Чистый положительный заряд	Чистый положительный заряд	Чистый положительный заряд

Измерение размера частицы

Средний диаметр частиц и индекс полидисперсности были похожи у контрольных трансферсом и у тех, которые содержат пальмитоилпептиды. Это означает, что 10% замещение полисорбата 80 пальмитоилпептидом в трансферсомах не влияло на характеристики размера.

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны

Значение деформируемости P* было одинаковым для контрольных трансферсом и трансферсом содержащих пальмитоилпептиды. Значение для пальмитоилтетрапептид 7 трансферсом было немного ниже, что указывает на то, что 10% замещение полисорбата 80 сложным эфиром может иметь немного размягчающее действие на мембрану, делая везикулы более деформируемыми. Однако это не было доказательством % восстановления после фильтрования, который был аналогичным для пальмитоилпептидных трансферсом по сравнению с контрольными, так что возможность более низкой P* незначительна.

Средний диаметр частиц после ПНМ фильтрации уменьшался почти на 50% по сравнению с предварительной фильтрацией и для контрольных трансферсом, и для трансферсом, содержащих пальмитоилпептид. Индекс полидисперсности была немного выше, что свидетельствует о более широком распределении по размерам. Эти характеристики являлись ожидаемыми для трансферсомных везикул.

Исследование концентрации пептида (CBQCA)

Пальмитоилтетрапептид 7 трансферсомы не образовывались в результате CBQCA исследования из-за отсутствия остатков лизина в последовательности необходимой для реакции с реагентом. Тем не менее, пальмитоилтрипептид 1 определялся, поскольку он содержит лизин. Так как не было возможности солюбилизировать пальмитоилтрипептид 1 в водных средах, подходящих для исследования; определение концентрации трипептида 1 в трансферсомах было проведено относительно стандарта бычьего сывороточного альбумина (БСА). БСА является 66 кДа белком с 58 остатками лизина; ~1 на 1138 Да пептида. Пептид содержит 1 лизин на 340 Да. Определяли пептид, и была предпринята попытка определить количество путем коррекции разницы в концентрации лизина между БСА и пептидом, однако общий пептид по-прежнему оказался переоцененным; 424 мкг/мл по сравнению с теоретическим значением 221 мкг/мл.

Электрофорез на бумаге

Контрольные трансферсомы и все трансферсомы, содержащие пептидпальмитоил, мигрировали к катоду аппарата для электрофореза, демонстрируя чистый положительный заряд. Следовательно, наличие пальмитоилтетрапептида 7 или пальмитоилтрипептида 1 не изменяло характеристики заряда трансферсом.

Пример композиции 16 и ее получение и исследование

Композиция 16 содержит или фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (6,55 мг/г)

в качестве поверхностно-активного вещества, напроксен-полисорбат (2,195 мг/г) в качестве АПИ, фосфатный буфер (pH 7,7) и этанол (47,56 мг/г) или фосфатидилхолин (68,700 мг/г) в качестве липида, Tween 80 (5,80 мг/г) в качестве поверхностно-активного вещества, диклофенак-полисорбат (2,96 мг/г) в качестве АПИ, фосфатный буфер (pH 7,7) и этанол (47,54 мг/г).

Краткое описание

Успешно получали композиции трансферсом, содержащие ковалентно связанные нестероидные противовоспалительные средства (НПВС); напроксен и диклофенак; с 20% молярным замещением полисорбата 80. Результаты исследований показали, что распределение размеров, характеристики деформируемости и заряд трансферсом не были затронуты включением НПВС, так что сложные эфиры НПВС были доступны на внешней поверхности трансферсом к действию фермента карбоксилэстеразы и что НПВС трансферсомы имели более сильное ингибирующее действие в исследовании ингибирования фермента COX-1, нежели только контрольные трансферсомы. НПВС трансферсомы сохраняли свою ингибирующую активность после деформации при прохождении через поры, которые были меньше, чем их средний размер.

Изготовление

Получали трансферсомы, используя соевый фосфатидилхолин (Lipoid SPC S-100) и полисорбат 80, содержащие или сложный эфир напроксен-полисорбат 80 (Key Organics DK-0035-3), или сложный эфир диклофенак-полисорбат 80 (Key Organics DK-0036-3). Также получали контрольную партию трансферсом.

Получение НПВС трансферсом

Получали 20 г порцию напроксен-полисорбатных трансферсом и 20 г порцию диклофенак-полисорбатных трансферсом, используя молярное соотношение соевый фосфатидилхолин:полисорбат 80:НПВС-полисорбат 80 13,3:0,8:0,2 (рассчитано для чистых сложных эфиров НПВС-полисорбат 80).

Используя осторожное нагревание и перемешивание, соевый фосфатидилхолин (1,374 г) с или полисорбатом 80 (0,131 г) и напроксен-полисорбатом (0,0439 г), или полисорбатом 80 (0,116 г) и диклофенак-полисорбатом (0,0592 г) растворяли в этаноле с получением общей массы 2,50 г.

Фосфатный буфер pH 7,7 (17,50 г) интенсивно перемешивали при 35°C и в это время из шприца, оснащенного широкой иглой, добавляли композицию соевого фосфатидилхолина. Смесь перемешивали около 15 мин.

Трансферсомы получали путем экструзии через 0,2 мкм фильтр, затем через 0,1 мкм фильтр и затем через 0,1 мкм фильтр, используя фильтровальную систему Sartorius 47 мм при 35°C с давлением азота 4 бар. Каждый фильтр имел сверху стекловолоконный фильтр предварительной очистки. Трансферсомы хранили в темноте при +5°C.

Получение контрольных трансфертом

Получали 50 г партию контрольных трансферсом, используя молярное соотношение соевого фосфатидилхолина:полисорбат 80 13,3:1.

Используя осторожное нагревание и перемешивание, соевый фосфатидилхолин (3,44 г) и полисорбат 80 (0,425 г) растворяли в этаноле с получением общей массы 6,26 г.

Фосфатный буфер pH 7,7 (43,74 г) интенсивно перемешивали при 35°C и в это время из шприца, оснащенного широкой иглой, добавляли композицию соевого фосфатидилхолина. Смесь перемешивали около 15 мин.

Контрольные трансферсомы экструдировали, как описано для партий НПВС трансферсом. Трансферсомы хранили в темноте при +5°C.

Аналитические методы измерение размера частиц

Определяли средний размер частиц и распределение частиц по размерам для композиций трансферсом методом динамического светорассеяния, используя фотонно-корреляционный спектрометр. Когда когерентный свет проходит через суспензию частиц, свет рассеивается во всех направлениях. Измерением и корреляцией интенсивности рассеянного света суспензии частиц можно определить распределение размеров и размер частиц в суспензии.

Определяли средний размер частиц и распределение по размерам частиц для каждого образца с использованием фотонно-корреляционного спектрометра ALV-5000/E. Образцы разводили деионизированной водой с получением детектируемого сигнала в диапазоне 50-500 кГц и затем анализировали, используя более шести измерений, каждое длительностью 30 с. Температуру поддерживали на уровне 25°C. Данные подвергали анализу регуляризированной кумулятивной подгонки второго порядка для получения среднего размера частиц (приводится как r или средний радиус), а также распределения размеров частиц для образца (приводится как w или ширина). Средний радиус умножали на 2 с получением среднего диаметра (нм).

Рассчитывали индекс полидисперсности (ИПД) для каждого образца согласно следующему уравнению:

$$ИПД = \left(\frac{w}{r}\right)^2$$

где

w = ширина и
r = средний радиус.

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны (ПНМ) использует приложенное давление, чтобы получить энергию активации трансферсом, обеспечивающую ей деформацию и прохождение через поры фильтра, которые меньше, чем средний размер трансферсом.

Мембранный фильтр Anodisc 13 (размер пор 20 нм) устанавливали на фильтрационной опоре в основе фильтрующего устройства и сверху присоединяли бак из нержавеющей стали. 3 мл образец трансферсом, предварительно уравновешенной при 25°C, помещали в бак и вокруг него обматывали теплопередающую трубку, соединенную с термоциркулятором (25°C). К баку присоединяли трубку под давлением, соединенную с азотным баллоном. Используя серию клапанов, в системе создавали давление 9,5 бар, с получением начального давления 7,5 бар. Устройство фильтрации помещали на накопительную емкость, расположенную на точно взвешиваемых весах, которые были подключены к компьютерной программе Excel. Контроллер давления Бронкхурст использовали для управления и мониторинга давления, и когда система клапанов была открыта и время запущено, регистрировали увеличение массы фильтрата трансферсом на весах от снижения давления и увеличения времени.

Оценивали данные времени, давления, массы в программе MathCAD для определения значения P*. P* представляет собой меру активации давления, необходимого для проникновения через поры, и, следовательно, меру жесткости мембраны трансферсомы. Средний размер частиц трансферсом измеряли с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии до и после фильтрации пнм.

Расщепление карбоксилэстеразой и ОФ-ВЭЖХ

Проводили высвобождение присоединенных нестероидных противовоспалительных средств (НПВС); диклофенак или напроксен; с внешней поверхности трансферсом, содержащих сложные эфиры полисорбата 80 любого из двух соединений, с помощью ферментного расщепления сложного эфира с использованием изоформы B карбоксилэстеразы 1 (Sigma E0287). 960 единиц фермента добавляли на мл трансферсом, перед инкубацией при температуре +37°C. Отбирали образцы через 4 ч и высвобожденное НПВС экстрагировали добавлением 1 объема ацетонитрил/метанол/муравьиная кислота (80 об./20 об./0,2 об.) с последующей обработкой ультразвуком в течение 5 мин и центрифугированием с осаждением нерастворимых компонентов. Образцы надосадочной жидкости затем фильтровали через мембрану 0,2 мкм и разбавляли 1 к 10 ультравысокочистотой водой.

Образцы анализировали с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления (ОФ-ВЭЖХ) с использованием колонки Kinetex C18 5 мкм 100A колонки 4,6x150 мм и модуля разделения Waters 2695 при +25°C и градиента согласно таблице ниже, где в качестве элюента A была 0,1% трифторуксусная кислота в сверхвысокочистой воде и элюента B была 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле. Обнаружение обоих НПВС проводили при длине волны 254 нм с использованием детектора Waters 2487.

Время (минут)	**Поток (мл/мин)**	**% Элюент A**	**% Элюент B**
0	1,2	95	5
15	1,2	5	95
20	1,2	5	95
21	1,2	95	5
25	1,2	95	5

Кроме того, была проанализирована стандартная кривая для каждого НПВС в диапазоне от 0,4 до 91 мкг/мл, используя тот же самый способ ОФ-ВЭЖХ. Пики НПВС были интегрированы в полученные хроматограммы для образцов и стандартов. Анализировали площади пиков стандартов с линейной регрессией для получения уравнений для стандартных кривых. Площади пиков образцов затем использовали для определения концентрации высвобожденного НПВС из уравнения для соответствующей стандартной кривой с учетом разведения от способа экстракции. Концентрацию сравнивали с общей теоретической концентрацией НПВС для расчета % НПВС, высвобождаемого с внешней поверхности НПВС трансферсом.

Исследование ингибирования циклооксигеназы-1

Исследование ингибирования циклооксигеназы 1 (COX-1) измеряет способность лекарственных средств, таких как НПВС, ингибировать активность фермента COX-1. COX-1 катализирует превращение арахидоновой кислоты в простагландин H_2. Во время реакции фермент потребляет кислород. Скорость потребления кислорода (нмоль/мл/мин) является мерой скорости реакции и уменьшается в присутствии ингибиторов.

Исследование ингибирования COX устанавливают с помощью системы Hansatech Oxygraph, которая содержит калиброванный кислородный электрод Clark, присоединенный к программному обеспечению Oxygraph Plus. Реакционную смесь, содержащую 0,1 мМ фосфата калия pH 7,2, 2,0 мМ фенола, 1 мкМ гематина, перемешивали в реакционной камере при температуре 37°C до тех пор, пока не будет получен стабильный базовый кислород. Добавляли 340 единиц фермента COX-1 (Cayman Chemicals CAY60100), уравновешивали в течение 1 мин и затем добавляли субстрат, арахидоновую кислоту.

Проводили серию контрольных реакций с использованием арахидоновой кислоты в конечных концентрациях 8, 16, 32 и 64 мкМ. Для каждой реакции максимальная скорость реакции была измерена на кривой кислорода Oxygraph.

Для определения ингибирующего действия образцов трансферсом контрольные, напроксеновые или диклофенаковые трансферсомы предварительно смешивали с арахидоновой кислотой в течение 10 мин при комнатной температуре и затем к реакции добавляли смесь арахидоновой кислоты. Концентрации были выбраны так, чтобы конечные концентрации арахидоновой кислоты в реакции были 8, 16, 32 и 64 мкМ.

Концентрацию арахидоновой кислоты наносили на график относительно скорости реакции (нмоль кислорода/мл/мин) для контроля, реакций контрольных трансферсом и НПВС трансферсом и рассчитывали значение для % ингибирования трансферсомами путем сравнения скорости реакции четырех концентраций субстрата и усреднения снижение скорости. Также строили обратные графики Лайнуивера-Бурка (1/концентрация арахидоновой кислоты от 1/скорости реакции).

Исследование ингибирования COX-1 также проводили на образцах трансферсом, которые были обработаны в исследовании приспособляемость непрерывной мембраны (ПНМ), к которым прикладывалось давление для обеспечения энергии активации достаточной для деформирования везикул и прохождения через поры, которые были меньше, чем их средний диаметр.

Электрофорез на бумаге

Исследовали характеристики зарядов композиций трансферсом с помощью электрофореза на бумаге, где полоски бумаги подвешивали между двумя резервуарами наполненными буферами, тестируемый образец наносили на полоску и к полоске прикладывали электрический ток. Заряженные частицы мигрировали вдоль полоски, из направления и расстояния движения определяли чистый заряд частиц в pH буфере.

Каждый исследуемый образец наносили в объеме (100 мкл) по центру отдельных 2×20 см полосок фильтровальной бумаги Ватмана (предварительно смоченных рабочим буфером; 2,3 мг/мл хлорида натрия, 1,5 мг/мл хлорида кальция, 1,3 мг/мл глицилглицина, 25 мг/мл маннита, 10 мг/мл сахарозы и 0,5 мг/мл метионина pH 5,75) и исследовали при 130 В в течение 2 ч. Каждую полосу окрашивали ПЭГ (компонент полисорбата 80) с 5% мас./об. хлорида бария и 0,05 М йода и затем сушили. Измеряли расстояние движения трансферсом от центральной точки для каждого образца для анодной и катодной сторон полоски, чтобы определить суммарный заряд везикулы.

Результаты и обсуждения

Результаты сведены в табл. 6.

Таблица 6. Исследование контрольных и НПВС трансферсом

	Контрольные трансферсомы	**Напроксеновые трансферсомы**	**Диклофенаковые трансферсомы**
Фотонно-корреляционная спектрометрия:			
Средний диаметр частиц (нм)	137,98	135,90	135,34
Индекс полидисперсности	0,067	0,058	0,045
Исследование ПНМ:			
Восстановление после фильтрации %	18,0	42,3	41,8
Деформируемость P*	1,632	1,321	1,339

Средний диаметр частиц после ПНМ (нм)	72,72	77,22	73,02
Индекс полидисперсности после ПНМ	0,13	0,078	0,093
Расщепление карбоксилэстеразой / ВЭЖХ:			
Теоретическая концентрация НПВС	0 мМ / 0 мкг/мл	1,30 мМ / 299 мкг/мл	1,30 мМ/ 385 мкг/мл
Концентрация высвобожденного внешнего НПВС	Н/С	10 мкг/мл (3,3%)	21 мкг/мл (5,5%)
Исследование ингибирования COX-1:			
Ингибирование	53%	75%	62%
Ингибирование после-ПНМ	33%	59%	40%
Электрофорез на бумаге	Чистый положительный заряд	Чистый положительный заряд	Чистый положительный заряд

Измерение размера частицы

Средний диаметр частиц и индекс полидисперсности были похожи у контрольных трансферсом и у тех, которые содержат сложный эфир НПВС-полисорбат 80. Это означает, что 20% замещение полисорбата 80 или напроксен-полисорбатом 80, или диклофенак-полисорбатом 80 в трансферсомах не влияло на характеристики размера.

Исследование приспособляемости непрерывной мембраны

Значение деформируемости P* было немного ниже для трансферсом, содержащих сложный эфир НПВС-полисорбат, нежели у контрольных трансферсом, что указывает на то, что 20% замещение полисорбата 80 или напроксен-полисорбатом 80, или диклофенак-полисорбатом 80 имеет немного размягчающее действие на мембрану, делая везикулы более деформируемыми. Это также выплывало из % восстановления после фильтрования, который увеличивался для напроксеновых или диклофенаковых трансферсом по сравнению с контрольными.

Средний диаметр частиц после ПНМ фильтрации уменьшался почти на 50% по сравнению с предварительной фильтрацией и для контрольных трансферсом, и для трансферсом, содержащих сложный эфир НПВС-полисорбат. Индекс полидисперсности была немного выше, что свидетельствует о более широком распределении по размерам. Эти характеристики являлись ожидаемыми для трансферсомных везикул.

Расщепление карбоксилэстеразой и ОФ-ВЭЖХ

Инкубация трансферсом, содержащих сложный эфир НПВС-полисорбат, с ферментом карбоксилэстеразой 1 привело к высвобождению от 3 и 6% от общей концентрации НПВС, что указывает на то, что маленькая часть напроксена или диклофенака, которые были прикреплены к внешней поверхности трансферсомы, была доступна для фермента.

Исследование ингибирования циклооксигеназы-1

Трансферсомы, содержащие сложный эфир НПВС-полисорбат, ингибируют скорость реакции фермента циклооксигеназы 1 (COX-1) с большим процентом, чем контрольные трансферсомы. Контрольные трансферсомы ожидаемо ингибировали фермент COX-1, и прикрепленные известные ингибиторы COX-1, напроксен или диклофенак, к внешней поверхности трансферсомы, еще больше повышают ингибирующее действие.

Фиг. 1 и 2 иллюстрируют графики концентрации арахидонового субстрата от скорости реакции и обратный график (Лайнуивера Бурк), соответственно.

Трансферсомы, которые были деформированы при прохождении через поры, которые были меньше, чем их средний размер, в исследовании приспособляемости непрерывной мембраны (ПНМ) сохраняли способность ингибировать фермент СОХ-1.

Фиг. 3 и 4 иллюстрируют графики концентрации арахидонового субстрата от скорости реакции и обратный график (Лайнуивера Бурк), соответственно, для образцов после ПНМ.

Процент ингибирования фермента СОХ-1 был несколько ниже после ПНМ исследования для всех 3 композиций трансферсом. Была выдвинута гипотеза, что это обусловлено уменьшением концентрации трансферсом и связанных с ними НПВС, вызванных фильтрацией, а не утратой активности НПВС. Показатель сравнительной концентрации трансферсомы получили с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии. Интенсивность частоты сигнала для пост-ПНМ образцов снизилась по сравнению с образцами до ПНМ, но была установлена подобность для контрольных и НПВС трансферсом, несмотря на различия восстановления после фильтрации ПНМ.

Электрофорез на бумаге

Контрольные трансферсомы и трансферсомы, содержащие сложный эфир НПВС-полисорбат, все мигрировали к катоду в аппарате для электрофореза, демонстрируя чистый положительный заряд. Следовательно, присутствие напроксена или диклофенака не изменяет характеристики заряда трансферсом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Везикулярная композиция для доставки Агента, Представляющего Интерес (АПИ), через кожу пациента, содержащая везикулы, которые содержат фосфолипид, неионогенное поверхностно-активное вещество и модифицированный компонент, при этом указанный модифицированный компонент представляет собой фосфолипид или поверхностно-активное вещество, связанные с указанным АПИ таким образом, что, когда указанный АПИ находится снаружи везикулы, то вся молекула АПИ находится с внешней стороны по отношению к везикулярной мембране,

где фосфолипид представляет собой фосфатидилхолин;

неионогенное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полиоксиэтилен-сорбитана, полигидроксиэтиленстеарата и полигидроксиэтилен-лаурилового простого эфира; и

АПИ выбран из группы, состоящей из структурного белка кожи, такого как эластин или коллаген, терапевтического белка, углевода, хромофорсодержащей макромолекулы, такой как порфирин, витамина, металла или соли металла, неметаллического элемента или соли неметалла, меланина, или противовоспалительного средства, такого как НПВС (нестероидное противовоспалительное средство).

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что АПИ связан с поверхностно-активным компонентом везикулы.

3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что АПИ связан с фосфолипидным компонентом везикулы.

4. Композиция по любому одному из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанные везикулы содержат как модифицированный поверхностно-активный компонент, так и модифицированный фосфолипидный компонент.

5. Композиция по любому одному из пп.1-3, отличающаяся тем, что одна молекула АПИ связана с компонентом везикулы.

6. Композиция по любому одному из пп.1-4, отличающаяся тем, что множество молекул АПИ связано с компонентом везикулы.

7. Композиция по любому одному из пп.1-6, отличающаяся тем, что указанная связь является ковалентной связью.

8. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что указанные АПИ являются одинаковыми.

9. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что указанные АПИ являются разными.

10. Композиция для применения по п.1, отличающаяся тем, что композиция наносится местно.

11. Везикулярная композиция по любому одному из пп.1-10, отличающаяся тем, что указанная композиция подходит для применения в качестве лекарственного средства.

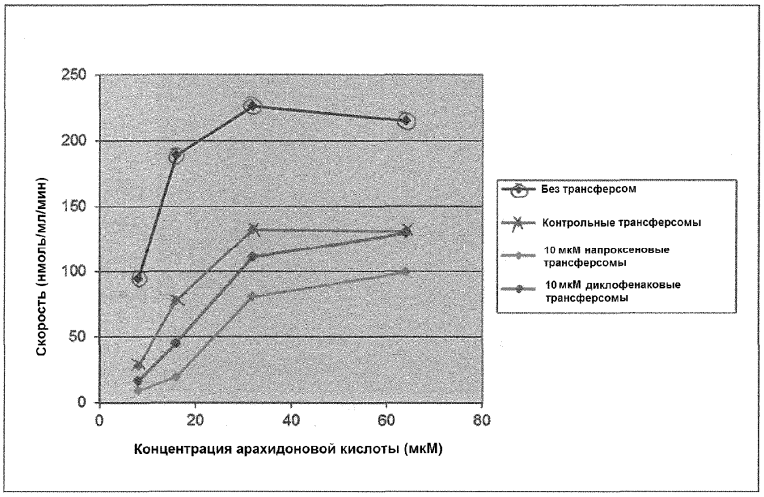
12. Везикулярная композиция по любому одному из пп.1-10, отличающаяся тем, что указанная композиция подходит для применения для ухода за кожей или в косметических средствах.

13. Способ доставки Агента, Представляющего Интерес (АПИ), через кожу пациента, включающий местное нанесение на кожу пациента везикулярной композиции по любому одному из пп.1-9 в количестве, достаточном для проникновения через кожу и доставки АПИ.

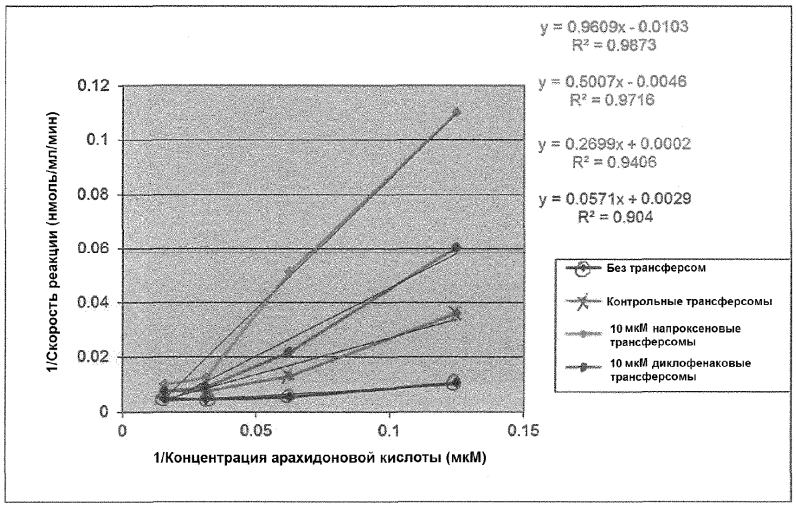
14. Способ доставки АПИ по п.13, отличающийся тем, что везикулярной композицией является композиция по любому одному из пп.8-9 или смесь везикулярных композиций по любому одному из пп.1-6, каждая с разным АПИ.

15. Способ получения композиции по любому одному из пп.1-9, включающий присоединение Агента, Представляющего Интерес (АПИ), к фосфолипидному или поверхностно-активному компоненту с

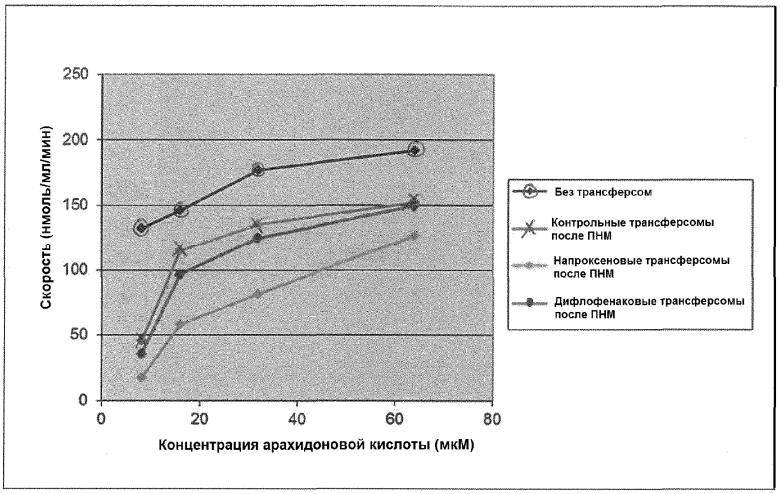
получением модифицированного компонента и смешивание указанного модифицированного компонента с фосфолипидом или неионогенным поверхностно-активным веществом таким образом, что, когда указанный АПИ находится снаружи везикулы, то вся молекула АПИ находится с внешней стороны по отношению к везикулярной мембране.



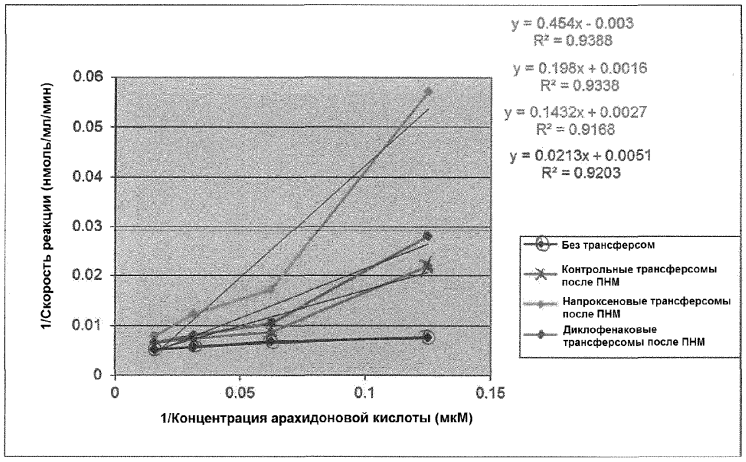
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2