



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103794** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)

**A61K 31/357** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 47/02** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2006.01)  
**A61K 47/24** (2006.01)  
**A61K 47/28** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2011 11426</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>30.03.2010</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.11.2013</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>2009-082521, 61/164,653</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>30.03.2009, 30.03.2009</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>JP, US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.11.2011, Бюл.№ 22</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/JP2010/055770, 30.03.2010</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Кікучі Хіроші (JP), Хьодо Кенджі (JP), Ішіхара Хіроші (JP)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ЕЙСАЙ АР ЕНД ДІ МЕНЕДЖМЕНТ КО., ЛТД., 6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan (JP)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Пахаренко Олександр Володимирович, реєстр. №136</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>WANG Y., ET AL.: 'Eribulin Mesilate. Antimitotic drug, Tubulin polymerization inhibitor, Oncolytic' DRUGS OF THE FUTURE vol. 32, no. 8, 2007, pages 681 - 698</b> <b>HARAN G ET AL: "Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, vol. 1151, no. 2, 19 September 1993 (1993-09-19), pages 201-215</b> <b>WO 2008/080367 A1, 10.07.2008 &amp; EP 2123260 A1, 25.11.2009</b> <b>JP 2005509000 A, 07.04.2005 &amp; WO 03/041681 A2, 22.05.2003</b></p>
---	---

**(54) ЛІПОСОМНА КОМПОЗИЦІЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується ліпосомної композиції, що містить (i) активну сполуку, (ii) сіль амонію і (iii) сіль, кислоту, основу і/або амінокислоту у внутрішній фазі ліпосоми, де активною сполукою є ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль, і способу її одержання.

UA 103794 C2



## Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до нової ліпосомної композиції, що містить ерибулін або його фармакологічно прийнятну сіль. Даний винахід також відноситься до способу виробництва ліпосомної композиції.

## 5 Попередній рівень техніки

Ліпосоми - мікроскопічні закриті пухирці, що мають внутрішню фазу, захищену одним або більше подвійними ліпідними шарами, і здатні до утримування гідросолюбільного матеріалу у внутрішній фазі і ліпофільного матеріалу в подвійному ліпідному шарі. Інкапсуляція активної сполуки в ліпосому і постачання її до тканини-мішені, високоефективний спосіб інкапсуляції активної сполуки в ліпосому, і спосіб забезпечення стабільного утримування активної сполуки ліпосомою, становлять важливі проблеми.

10 Інкапсулюючи ліпофільні сполуки в ліпосому, може відносно легко досягатися високий ступінь інкапсуляції, але за винятком сполук, які мають дуже високу мембранну афінність, таких як амфотерицин В (основний агент в ліпосомному препараті Ambisome), стабільність утримування в сироватці крові звичайно є низькою, і важко одержати істотне поліпшення фармакокінетики. Щодо способів інкапсуляції гідросолюбільних сполук в ліпосому, є різні способи, такі як спосіб ліпідної плівки (вихровий спосіб), спосіб зворотно-фазового випарювання, спосіб видалення поверхнево-активної речовини, спосіб заморожування-відтавання, і способи «безконтактного» завантаження (pH градієнтний спосіб, іонний градієнтний спосіб). Однак, тільки способи «безконтактного» завантаження забезпечують близько до 100% ступінь інкапсуляції; ступінь інкапсуляції, одержаний від інших способів становить приблизно тільки 5-30 %.

20 Як способи «безконтактного» завантаження, ті, які використовують градієнт pH і градієнт іонів сульфату амонію, відомі. pH градієнтний спосіб, який є способом «безконтактного» завантаження, використовуючи градієнт pH, є способом інкапсуляції сполук в ліпосому, використовуючи динаміку молекулярної/іонної рівноваги дисоціації через pH цільової сполуки.

25 Як один приклад сполуки, інкапсульованої в ліпосому способом градієнта pH, один може бути наведений, наприклад, доксорубіцин (DOX, pKa: 8,2). Після одержання розчину ліпосоми з буферним розчином pH 4, зовнішня фаза ліпосоми заміщується буферним розчином pH 7. У випадку, коли DOX доданий до цього розчину ліпосоми, оскільки молекулярний DOX в pH 7 розчині є ліпофільним, він мігрує до ліпосомної мембрани, а не до водної фази. У випадку, коли DOX, який мігрував до ліпосомної мембрани, додатково контактує з pH 4 внутрішньої фази ліпосоми, стає іонним, і включається у внутрішню фазу ліпосоми. Таким чином, DOX транспортується від зовнішньої фази до внутрішньої фази ліпосоми динамікою рівноваги дисоціації (див. Непатентну літературу 1, Непатентну літературу 2, і Патентну літературу 1).

30 Повідомлено про безліч способів поліпшення цього типу способу «безконтактного» завантаження. У Непатентній літературі 3, розкриті способи поліпшення ступеня інкапсуляції активних сполук, додаючи етиловий спирт разом з активною сполукою до зовнішньої фази ліпосоми, коли pH градієнтний спосіб проводиться в ліпосомі спеціальної композиції, називаної безхолестериновою ліпосомою.

40 У Патентній літературі 2, на додаток до градієнта pH, розкриті способи поліпшення ступеня інкапсуляції активних сполук при наявності іонів міді, присутніх у внутрішній фазі ліпосоми.

45 Замість градієнта pH в способі градієнта pH, амоній-сульфатний спосіб, який є способом «безконтактного» завантаження, використовуючи градієнт іонів сульфату амонію, є способом інкапсуляції активної сполуки у внутрішню фазу ліпосоми при використанні іонного градієнта, такого, як сульфат двовалентного амонію (див. Непатентну літературу 1 і Патентну літературу 3).

50 На додаток до іонного градієнта на основі сульфаті амонію, Патентна література 4 розкриває спосіб інкапсуляції активної сполуки в ліпосому шляхом додавання боронової кислоти разом з активною сполукою до зовнішньої фази ліпосоми.

Замість іонного градієнта на основі сульфата амонію, Патентна література 5 розкриває спосіб, у якому порівняно з випадком, де використовується сульфат амонію, швидкість вивільнення активної сполуки поліпшена шляхом інкапсуляції активної сполуки в ліпосому, використовуючи іонний градієнт аніона глюкуронової кислоти.

55 Таким чином, з погляду ступеня інкапсуляції, способи «безконтактного» завантаження є чудовим способами інкапсуляції. Однак, у випадку, коли використовуються способи «безконтактного» завантаження, за винятком особливих випадків, таких як Doxil (ліпосомний препарат DOX), де активна сполука, інкапсульована у внутрішню фазу ліпосоми кристалізується, що є проблемою, оскільки активна сполука має тенденцію просочуватися з ліпосоми в сироватку крові і стабільність утримування активної сполуки є низькою.

Як описано вище, із звичайними технічними способами сучасне положення полягає в тому, що важко досягти співіснування високого ступеня інкапсуляції активної сполуки в ліпосомі і стабільності утримання активної сполуки в ліпосомі.

Література попереднього рівня техніки

5 Патентна література

Патентна література 1: Патент США 5192549, Опис

Патентна література 2: Міжнародна публікація PCT WO2006/037230, Брошура

Патентна література 3: Патент США 5316771, Опис

Патентна література 4: Патент США 6051251, Опис

10 Патентна література 5: Міжнародна публікація PCT WO2005/046643, Брошура

Непатентна література

Непатентна література 1: Yasuyuki Sazuka, "Liposome Preparation Method," "New Developments in Liposome Application: Toward the Development of Artificial Cells" (Kazunari Akiyoshi, Shigeru Tsujii, editorial supervision)" NTS, (2005), pp. 33–37,

15 Непатентна література 2: Mayer LD et al., Biochimica et Biophysica Acta, (1986), 857: pp. 123–126,

Непатентна література 3: N. Dos Santos et al., Biochimica et Biophysica Acta, (2004), 1661(1): pp. 47–60,

Короткий зміст винаходу

20 Проблема, яка вирішується винаходом

Об'єктом даного винаходу є забезпечення ліпосомної композиції з високим ступенем інкапсуляції і стабільністю утримування активної сполуки.

Засоби вирішення проблем

У результаті ретельного дослідження, націленого на вирішення вищезгаданих проблем, дані винахідники виявили щодо ліпосомної композиції, активною сполукою, якої є ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль, що ступінь інкапсуляції і стабільність утримування активної сполуки в ліпосомній композиції є надзвичайно високою, що таким чином удосконалює даний винахід.

А саме, даний винахід полягає в наступному.

30 (1) Ліпосомна композиція, що містить ліпосому і активна сполука, що міститься у внутрішній фазі ліпосоми, де активною сполукою є ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль.

(2) Ліпосомна композиція згідно 1, де ліпосомна композиція перебуває в твердій або рідкій формі.

35 (3) Ліпосомна композиція згідно 1 або 2, де внутрішня фаза ліпосоми додатково містить сіль амонію.

(4) Ліпосомна композиція згідно 3, де концентрація вищезгаданої солі амонію становить 10 мМ або більше.

(5) Ліпосомна композиція згідно з кожним 1-4, де внутрішня фаза ліпосоми додатково містить сіль, кислоту, основу та/або амінокислоту.

40 (6) Ліпосомна композиція згідно 5, де концентрація вищезгаданої солі становить 1-300 мМ.

(7) Ліпосомна композиція згідно 5 або 6, де концентрація вищезгаданої кислоти становить 1-300 мМ.

(8) Ліпосомна композиція за будь-яким з 5-7, де концентрація вищезгаданої амінокислоти становить 1-300 мМ.

45 (9) Ліпосомна композиція за будь-яким з 5-8, де концентрація вищезгаданої основи становить 1-300 мМ.

(10) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-9, де концентрація вищезгаданої активної сполуки становить 0,01-300 мг/мл.

50 (11) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-10, де вищезгаданою активною сполукою є ерибулін мезилат.

(12) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-11, де внутрішня фаза ліпосоми додатково містить сульфат амонію, лимонну кислоту і активну сполуку.

(13) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-12, де зовнішня фаза ліпосоми містить цукор, електроліт, та/або амінокислоту.

55 (14) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-13, де зовнішня фаза ліпосоми містить цукор, електроліт та/або амінокислоту.

(15) Ліпосомна композиція згідно з 13 або 14, де концентрація вищезгаданого цукру становить 2 - 20 %.

60 (16) Ліпосомна композиція за будь-яким з 13 - 15, де концентрація вищезгаданої амінокислоти становить 1-300 мМ.

(17) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-16, де зовнішня фаза ліпосоми містить сахарозу або хлорид натрію і гістидин.

(18) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-17, де вищезгадана внутрішня фаза ліпосоми по суті не містить циклодекстрин.

5 (19) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-18, де ліпосома містить гідрований фосфатидилхолін.

(20) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-19, де ліпосома містить холестерин.

(21) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-20, де ліпосома містить конденсат метоксиполіетиленгліколя.

10 (22) Ліпосомна композиція згідно 21, де вищезгаданим конденсатом метоксиполіетиленгліколю є конденсат дистеароїлфосфатидилетаноламін поліетиленгліколя.

(23) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-22, де ліпосома містить гідрований фосфатидилхолін, холестерин, і конденсат дистеароїлфосфатидилетаноламін поліетиленгліколя.

15 (24) Ліпосомна композиція згідно 23, яка містить 10 - 80 % вищезгаданого гідрованого фосфатидилхоліну, 1-60 % вищезгаданого холестерину і від 0 до 50 % вищезгаданого конденсату дистеароїлфосфатидилетаноламін поліетиленгліколя.

(25) Ліпосомна композиція за будь-яким з 1-24, де ліпосома містить гідрований фосфатидилхолін сої, холестерин і поліетиленгліколь 2000-фосфатидилетаноламін.

20 (26) Спосіб виробництва ліпосомної композиції за будь-яким з 1-25, який включає: стадію, на якій надана рідка ліпосомна дисперсія, що містить ліпосому;

стадію, на якій вищезгадану рідку ліпосомну дисперсію змішують з вищезгаданою активною сполукою; і

25 стадію, на якій вищезгадану активну сполуку вводять у внутрішню фазу ліпосоми вищезгаданої рідкої ліпосомної дисперсії.

(27) Спосіб згідно 26, де вищезгадана рідка ліпосомна дисперсія по суті не містить солі амонію в зовнішній фазі ліпосоми.

(28) Спосіб згідно 26 або 27, де рН зовнішньої фази ліпосоми вищезгаданої рідкої ліпосомної дисперсії складає 3-10.

30 (29) Спосіб за будь-яким з 26 - 28, де рН зовнішньої фази ліпосоми вищезгаданої рідкої ліпосомної дисперсії складає 7-10.

(30) Спосіб згідно 28 або 29, де вищезгаданим рН є рН зовнішньої фази ліпосоми вищезгаданої рідкої ліпосомної дисперсії у стадії, у якій змішані вищезгадана рідка ліпосомна дисперсія і вищезгадана активна сполука.

35 (31) Спосіб за будь-яким з 26 - 30, де стадія, у якій надана вищезгадана рідка ліпосомна дисперсія, включає: стадію, на якій наданий підготовчий розчин ліпосоми, що містить ліпосому і містить сіль амонію у внутрішній фазі ліпосоми і зовнішній фазі ліпосоми; і стадію, на якій заміщають або розбавляють зовнішню фазу ліпосоми вищезгаданого підготовчого розчину ліпосоми.

40 (32) Спосіб згідно 31, де стадія, у якій вищезгадана зовнішня фаза ліпосоми заміщена або розбавлена, є стадією, у якій рН зовнішньої фази ліпосоми є вищим, чим рН внутрішньої фази ліпосоми.

45 (33) Спосіб згідно 31 або 32, де стадія, у якій вищезгадана зовнішня фаза ліпосоми заміщена або розбавлена, є стадією, у якій різниця між рН внутрішньої фази ліпосоми і рН зовнішньої фази ліпосоми складає 1-5.

(34) Спосіб за будь-яким з 26 - 33, де рН вищезгаданої внутрішньої фази ліпосоми становить 3-9.

(35) Спосіб за будь-яким з 26-34, де рН вищезгаданої внутрішньої фази ліпосоми становить 4-9.

50 (36) Спосіб за будь-яким з 26-35, де рН вищезгаданої внутрішньої фази ліпосоми становить 5 – 8.

(37) Спосіб за будь-яким з 26-36, де зовнішня фаза ліпосоми є розчином, який містить електроліт у стадії, у якій вводять вищезгадану активну сполуку.

55 (38) Спосіб за будь-яким з 26-37, де вищезгадана рідка ліпосомна дисперсія по суті не містить циклодекстрин у внутрішній фазі ліпосоми.

(39) Спосіб за будь-яким з 26-38, який додатково містить стадію, на якій рН зовнішньої фази ліпосоми є нейтральним.

Ефект Винаходу

Згідно з даним винаходом, можливо запропонувати нову ліпосомну композицію. Ліпосомна композиція даного винаходу інкапсулює активну сполуку у внутрішню фазу ліпосоми з високим ступенем ефективності і має високу стабільність утримування активної сполуки.

Короткий Опис Фігур.

5 (Фіг. 1) показує *in vitro* зміни концентрації мезилату ерибуліну у ліпосомній композиції в сироватці крові пацієнта (37°C).

(Фіг. 2) показує *in vivo* протипухлинну активність ерибуліну мезилату через ліпосоми у FaDu безтимусних мишах-носіях раку.

10 (Фіг. 3) показує *in vivo* протипухлинну активність мезилату ерибуліну через ліпосоми у ACHN безтимусних мишах-носіях раку.

Переважний спосіб здійснення винаходу

Даний винахід конкретно описаний способами здійснення винаходу, але даний винахід не обмежений такими способами здійснення винаходу, і може бути здійснений з безліччю модифікацій.

15 Зміст, розкритий в літературі, на яку посилаються в даному винаході, включений в даний винахід як посилання.

(Визначення)

20 "Ліпосома" означає мікроскопічні закриті пухирці, що мають внутрішню фазу, захищену подвійним ліпідним шаром. В даному винаході ліпосома включає малу одномембранну ліпосому (SUV: малий моноламельярний пухирець), велику одномембранну ліпосому (LUV: великий моноламельярний пухирець), дуже велику одномембранну ліпосому (GUV: гігантський моноламельярний пухирець), багат шарову ліпосому, що має множинні концентричні мембрани (MLV: багат шаровий пухирець), ліпосому, що має множинні мембрани, які не є концентричними, але неоднорідними (MVV: мультівезикулярний пухирець), і т.і.

25 "Внутрішня фаза ліпосоми" означає водну область, включену в подвійний ліпідний шар ліпосоми, і використовується з тим же самим значенням як "внутрішня водна фаза" і "ліпосомна внутрішня водна фаза". "Зовнішня фаза ліпосоми" означає область, не включену в подвійний ліпідний шар ліпосоми (тобто, область за винятком внутрішньої фази і подвійного шару ліпідів) у випадку, коли ліпосома диспергована в рідині.

30 "Ліпосомна композиція" означає композицію, яка містить ліпосому і додатково містить мезилат ерибуліну у внутрішній фазі ліпосоми. В даному винаході ліпосомна композиція включає і тверді, і рідкі форми.

"Рідка ліпосомна дисперсія" означає композицію, що містить ліпосому і є попередньою композицією введення активної сполуки у внутрішню фазу ліпосоми.

35 "Підготовчий розчин ліпосоми" означає композицію, що містить ліпосому і є композицією попереднього коригування зовнішньої фази ліпосоми з метою інкапсуляції мезилату ерибуліну у внутрішню фазу ліпосоми.

40 "Ліпосомний реагент" означає рідку ліпосомну дисперсію у випадку, якщо перебуває в рідкій формі. У випадку, якщо перебуває у твердій формі, це означає реагент, з якого рідка ліпосомна дисперсія може бути одержана розчиненням або суспендуванням в запропонованому розчиннику. Розчинник описаний нижче. Як описано нижче, твердий ліпосомний реагент може бути одержаний, наприклад, висушуванням рідкої ліпосомної дисперсії.

45 В даному описі "змішування твердої і рідкої речовини" включає розчинення і суспендування твердої речовини в рідині і змішування, розчинення і суспендування використовуються взаємозамінним способом. Точно так само розчинник і дисперсійне середовище також використовуються взаємозамінним способом.

Крім того, ліпосомна композиція, рідка ліпосомна дисперсія, підготовчий розчин ліпосоми, і ліпосомний реагент даного винаходу по суті не містять циклодекстрин. "По суті не містять циклодекстрин" означає, що немає домішки циклодекстрина. Це достатньо, якщо циклодекстрин не міститься в кількості, при якій поліпшення солюбільності (номінальна солюбільність) активної сполуки внаслідок циклодекстрину є значно спостережуваним, і навіть У випадку, коли він доданий у кількості, при якій поліпшення солюбільності активної сполуки є незначно спостережуваним, це не повинно бути виключено із здійснення даного винаходу.

55 Крім того, як переважний спосіб даного винаходу "рідка ліпосомна дисперсія по суті не містить сіль амонію у зовнішній фазі ліпосоми" означає, що сіль амонію не додана до зовнішньої фази ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії. Додавання солі амонію у кількості, яка є в межах діапазону, який може досягти мети даного винаходу, не повинно бути виключено із здійснення даного винаходу. У випадку, коли сіль амонію міститься у зовнішній фазі ліпосоми підготовчого розчину ліпосоми, можливо одержати рідку ліпосомну дисперсію, яка по суті не містить солі

амонію, заміщаючи або розбавляючи зовнішню фазу ліпосоми підготовчого розчину ліпосоми, використовуючи розчин, який по суті не містить солі амонію.

(Активна сполука)

Активна сполука даного винаходу - ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль (надалі іноді називана "ерибулін, і т.і." ). Немає ніяких специфічних обмежень щодо фармакологічно допустимої солі, оскільки сіль ерибуліну утворюється з неорганічною кислотою або органічною кислотою. Наприклад, можна навести: сіль соляної кислоти, сіль сірчаної кислоти, цитрат, сіль бромводневої кислоти, сіль йодводневої кислоти, сіль азотної кислоти, бісульфат, сіль фосфорної кислоти, сіль пірофосфорної кислоти, ізонікотинової кислоти сіль, сіль оцтової кислоти, сіль молочної кислоти, сіль саліцилової кислоти, сіль винної кислоти, сіль пантотенової кислоти, аскорбінової кислоти сіль, сіль бурштинової кислоти, сіль малеїнової кислоти, сіль фумарової кислоти, глюконової кислоти сіль, глюкозарової кислоти сіль, сіль мурашиної кислоти, сіль бензойної кислоти, глутамінової кислоти сіль, метансульфонової кислоти сіль, етансульфонової кислоти сіль, бензолсульфонової кислоти сіль, п-толуолсульфонової кислоти сіль, сіль памової кислоти (памоат), і так далі.

Переважаючими серед них є сіль соляної кислоти, сіль сірчаної кислоти, сіль оцтової кислоти, сіль фосфорної кислоти, цитрат, і сіль мезилової кислоти, і більш переважною з усіх є сіль мезилової кислоти. Таким чином, переважною активною сполукою даного винаходу є ерибуліну мезилат. Крім того, як фармакологічно прийнятну сіль ерибуліну, прийнятно використовувати ерибулін і сіль алюмінію, кальцію, літію, магнію, кальцію, натрію, цинку і діетаноламіну. Ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль є сполукою або її сіллю, розкритою в міжнародній публікації PCT WO 99/65894, або патенті США 6214865 (зміст, розкритий в цих патентах, включений тут посиланням) і має фармакологічну дію, включаючи протипухлинну дію і антимітотичну дію. Ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль показують протипухлинну дію щодо наступних: меланома, фібросаркома, моноцитарний лейкоз, рак товстого кишечника, рак яєчника, рак молочної залози, рак кістки, рак простати, рак легенів, і RAS-трансформованих фібробластів.

Однак, як активні сполуки, які можуть бути скомбіновані з ерибуліном, і т.і., можна вибрати із числа сполук, використовуваних медичній галузі (включаючи діагностичні препарати ), косметичні вироби, продовольчі продукти, і так далі. Щодо активних сполук, їх прийнятно комбінувати з однією або більше сполук, окрім ерибуліну, і т.і.

Як активні сполуки, можна навести низькомолекулярні сполуки, і т.і. Серед них сполуки, використовувані як протипухлинні агенти, антибактеріальні агенти, проти запальні агенти, агенти проти інфаркту міокарда і контрастні агенти є прийнятними.

Щодо молекулярної маси активної сполуки діапазон 100 - 2000 є переважним, діапазон 200 - 1500 є більш переважним і діапазон 300 - 1000 є найбільш переважним. У межах цих діапазонів проникність ліпосомної мембрани активної сполуки є взагалі задовільною, і даний винахід може бути прийнятно застосованим.

Активні сполуки включають гідросолюбільні сполуки і ліпофільні сполуки, і поки вони є більш-менш розчинними у воді або водних розчинниках, даний винахід може бути застосований.

Немає ніяких певних обмежень щодо протипухлинних агентів в даному винаході, і можна навести, наприклад, похідні камфотерицину, такі як гідрохлорид іринотекану, ногітекану гідрохлорид, екзатекан, RFS-2000, луртотекан, BNP-1350, Bay-383441, PNU-166148, IDEC-132, BN-80915, DB-38, DB-81, DB-90, DB-91, CKD-620, T-0128, ST-1480, ST-1481, DRF-1042, DE-310; похідні таксану, такі як гідрид доцетакселу, доцетаксел, пакритаксел, IND-5109, BMS-184476, BMS-188797, T-3782, TAX-1011, SB-RA-31012, SBT-1514 і DJ-927; іфосфамід, німстину гідрохлорид, карвокон, циклофосфамід, дакарбазин, тіотепа, бусульфат, мелфаран, ранімустин, естрамустин фосфат натрій, рибозид 6-меркаптопурин, еноцитабін, гемцитабін гідрохлорид, кармфур, цитарабін, цитарабін оксифосфат, тегафур, доксифлуридин, гідроксикарбамід, фтороурацил, метотрексат, меркаптопурин, флударабін фосфат, актиноміцин D, акларубіцину гідрохлорид, ідарубіцину гідрохлорид, пікарубіцину гідрохлорид, епірубіцину гідрохлорид, даунорубіцину гідрохлорид, доксорубіцину гідрохлорид, епірубіцин, пікарубіцин, даунорубіцин, доксорубіцин, пікарубіцину гідрохлорид, блеоміцину гідрохлорид, зиностатину стималамер, неокарциностин, мітоміцин C, блеоміцину сульфат, пепломіцину сульфат, етопозид, вінорельбін тартрат, вінкрістину сульфат, віндезину сульфат, вінбластину сульфат, амрубіцину гідрохлорид, гефінітиб, екземестан, капецитабін, TNP-470, TAK-165, KW-2401, KW-2170, KW-2871, KT-5555, KT-8391, TZT-1027, S-3304, CS-682, YM-511, YM-598, TAT-59, TAS-101, TAS-102, TA-106, FK-228, FK-317, E7070, (8E, 12E, 14E)-7-[(4-циклогептипіперазин-1-іл)карбоніл]окси-3,6,16,21-тетрагідрокси-6,10,12,16,20-пентаметил-18,19-епокситрикоза-8,12,14-триєн-11-олід (E7107), KRN-700, KRN-5500, J-107088, HMN-214, CM 11355, ZD-0473, і

т.і. Щодо сполук, розкритих як солі серед вищезгаданих протипухлинних агентів, будь-яка сіль є прийнятною і вільні тверді речовини є також прийнятними. Щодо сполук, розкритих як вільні тверді речовини, будь-яка сіль є прийнятною.

Немає ніяких певних обмежень щодо антибактеріальних агентів, і можна навести, наприклад, амфотерицин В, цефотіам гексил, цефалоспорин, хлорамфенікол, диклофенак, і т.і. Щодо сполук вищезгаданих антибактеріальних агентів, будь-яка сіль є прийнятною.

Немає ніяких певних обмежень щодо протизапальних агентів і можна навести, наприклад, простагландини (PGE1, PGE2), дексаметазон, гідрокортизон, піроксикам, метиндол, преднізолон, і т.і. Щодо сполук вищезгаданих протизапальних агентів, будь-яка сіль є прийнятною.

Немає ніяких певних обмежень щодо агентів проти інфаркту міокарда і можна навести, наприклад, аденозин, атенолол, пілзиканід, і т.і., і як контрастні агенти, можна навести, наприклад, йопамідол, йоксаглова кислота, йогексол, йомепрол, і т.і. Щодо сполук вищезгаданих агентів проти інфаркту міокарда і контрастних агентів, будь-яка сіль є прийнятною.

(Ліпіди)

Переважно, що мембранні компоненти ліпосоми даного винаходу включають похідні фосфоліпідів та/або фосфоліпіди. Як фосфоліпіди і похідні фосфоліпідів, можна навести, наприклад, фосфатидилетаноламін, фосфатидилхолін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидилгліцерин, кардіоліпін, сфінгомієлін, церамід фосфорилетаноламін, церамід фосфорилгліцерин, церамід фосфорил гліцерин фосфат, 1,2-диміристоїл-1,2-деоксифосфатидилхолін, плазмалоген, фосфатидна кислота, і т.і. Також прийнятно комбінувати один або більше цих фосфоліпідів і похідних фосфоліпідів.

Немає ніяких певних обмежень щодо залишків жирної кислоти у фосфоліпідах і похідних фосфоліпідів, і можна навести, наприклад, насичений або ненасичений залишок жирної кислоти з вуглецевим числом 12 - 20. Зокрема, можна навести ацильні групи, одержані з жирних кислот, таких як лауринова кислота, міристинова кислота, пальмітинова кислота, стеаринова кислота, олеїнова кислота, і ліолева кислота. Можна також використовувати фосфоліпіди, одержані із природних речовин, таких як лецитин яєчного жовтка і лецитин сої, частково гідрований лецитин яєчного жовтка, ненасичений залишок жирної кислоти якого частково або повністю гідрований, (повністю) гідрований лецитин яєчного жовтка, частково гідрований лецитин сої, (повністю) гідрований лецитин сої, і т.і.

Немає ніяких певних обмежень щодо змішуваної кількості (мольна частка) фосфоліпідів та/або похідних фосфоліпідів, які використовуються, коли одержують ліпосоми, але кількість 10 - 80 % щодо всієї композиції ліпосомної мембрани є переважною і 30 - 60 % є більш переважною.

Щодо мембранних елементів, крім фосфоліпідів та/або похідних фосфоліпідів, ліпосома даного винаходу може також включати стерини, такі як холестерин і холестерин як мембранні стабілізатори, жирні кислоти, що мають насичені або ненасичені ацильні групи з вуглецевим числом 8 - 22, і антиоксиданти, такі як  $\alpha$ -токоферол.

Немає ніяких певних обмежень щодо змішуваної кількості (мольна частка) цих стеринів, які використовуються, коли одержують ліпосоми, але кількість 1-60 % щодо всієї композиції ліпосомної мембрани є переважною, 10 - 50 % є більш переважною, і 30 - 50 % є найбільш переважною.

Крім того, немає ніяких певних обмежень щодо змішуваної кількості (мольна частка) жирних кислот, але кількість від 0 до 30 % щодо всієї композиції ліпосомної мембрани є переважною, від 0 до 20 % є більш переважною, і від 0 до 10 % є найбільш переважною. Щодо змішуваної кількості (мольна частка) антиоксидантів є суттєвим, якщо додана кількість може надати антиоксидантний ефект, але кількість від 0 до 15 % усієї композиції ліпосомної мембрани є переважною, від 0 до 10 % є більш переважною, і від 0 до 5 % є найбільш переважною.

Ліпосома даного винаходу може також містити функціональні ліпіди і модифіковані ліпіди як мембранні компоненти.

Як функціональні ліпіди, можна навести похідні ліпідів, утримувані в крові, чутливі до температури похідні ліпідів, рН-залежні похідні ліпідів, і т.і. Як модифіковані ліпіди, можна навести ПЕГ-ліпіди, цукрові ліпіди, антитіло-модифіковані ліпіди, пептид-модифіковані ліпіди, і т.і.

Як похідні ліпідів, утримувані в крові, можна навести, наприклад, глікофорин, гангліозид GM1, гангліозид GM3, похідні глюкуронової кислоти, похідні глутамінової кислоти, полігліцеринфосфоліпідні похідні, похідні поліетиленгліколю (конденсати метоксиполіетиленгліколя, і т.і.), такі як N - [карбоніл - метоксиполіетиленгліколь - 2000] - 1,2-

дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін, N-[карбоніл - метоксиполіетиленгліколь-5000]-1,2-дипальмітоїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін, N-[карбоніл- метоксиполіетиленгліколь-750]-1,2-дистеароїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін, N-[карбоніл-метоксиполіетиленгліколь-2000]-1,2-дистеароїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін (МПЕГ 2000-дистеароїлфосфатидилетаноламін), і N-[карбоніл-метоксиполіетиленгліколь-5000]-1,2-дистеароїл-sn-гліцери-3-фосфоетаноламін, які є конденсатами фосфоетаноламіну і метоксиполіетиленгліколю. Маючи ліпосоми, що містять похідні ліпідів із властивостями утримування у крові, можливо поліпшити утримування у крові ліпосоми, тому що ліпосома стає важкою для поглинання печінкою, як стороннє включення.

Як чутливі до температури похідні ліпідів, можна навести, наприклад, дипальмітоїл фосфатидилхолін, і т.і. У випадку, коли ліпосоми містять чутливі до температури похідні ліпідів, можливо викликати деструкцію ліпосоми при певних температурах, і спричинити зміни у властивостях поверхні ліпосоми. Крім того, комбінуючи це із збільшенням температури на цільовій ділянці пухлини, і т.і., можливо зруйнувати ліпосому на цільовій ділянці і вивільнити активну сполуку на цільовій ділянці.

Як рН-залежні похідні ліпідів, можна навести, наприклад, діолеїл фосфатидилетаноламін, і т.і. У випадку, коли ліпосоми містять рН-залежні похідні ліпідів, можливо підтримати мембранний сплав ліпосоми і ендосоми, коли ліпосома включена у клітини через ендоцитоз, і поліпшувати передачу активної сполуки до клітин тканини.

Як цукрові ліпіди, антитіло-модифіковані ліпіди і пептид-модифіковані ліпіди, можна навести ліпіди, які зв'язані із цукром, антитілами або пептидами, які є сумісними із клітинами-мішенями або тканинами-мішенями. Використовуючи модифіковані ліпіди, ліпосома може бути активно передана до клітин-мішеней або тканини-мішені.

Немає ніяких певних обмежень щодо змішуваної кількості (мольна частка) похідних ліпідів із властивостями утримування у крові, використовуваними при приготуванні ліпосоми, але кількість від 0 до 50 % усіх ліпідних компонентів ліпосомної мембрани є переважною, від 0 до 30 % є більш переважною, і від 0 до 20 % є найбільш переважною.

(Ліпосома)

Як згадано вище, ліпосома - мікроскопічний закритий пухирець, що має внутрішню фазу, захищену подвійним ліпідним шаром.

Ідеально, відносно ліпосоми а) переважно, що ерибулін і т.і. має бар'єрну функцію, що запобігає витоку до зовнішньої фази ліпосоми після інкапсуляції ерибуліну і т.і. у внутрішню фазу ліпосоми. У випадку, коли використовується як медикамент, переважно, що ліпосома демонструє *in vivo* стабільність і що ерибулін і т.і. має бар'єрну функцію, яка запобігає його витоку до зовнішньої фази ліпосоми в крові, коли ліпосома призначається *in vivo*.

Композиція мембранних компонентів для ліпосоми, що має таку мембранну проникність на рівні, що дозволяє практичне застосування, може бути відповідно вибрана фахівцями в даній галузі відповідно до активної сполуки, тканини-мішеней т.п., посиляючись у міру необхідності на втілення, описані нижче (Hiroshi Kikuchi, et. al, "Liposome I-Preparation Method and Assay Method," Cell Technology (1983), 2(9): pp. 1136-1149, and reference literature cited in said literature).

Коли використовується як медикамент, переважно, що ерибулін і т.і. вивільняється з ліпосоми після того, як ліпосома досягає тканини-мішені, клітин або внутрішньоклітинних органел. Відносно ліпосоми самі мембранні компоненти є зазвичай біодеградуєчими і в остаточному підсумку розкладаються в тканині-мішені або подібних. Вважається, що інкапсульований ерибулін і т.і. вивільняється цим способом. Крім того, це також прийнятно, якщо сама ліпосома включена в клітини.

Крім того, що ліпосомна композиція може бути цільовою щодо тканини-мішені, такої як солідний рак, вона може також використовуватися, щоб доставити активні сполуки до клітин гематологічного раку і так далі. Вона може також використовуватися як композиція уповільненого вивільнення, композиція контрольованого вивільнення і т.і. у крові.

Розмір частинок ліпосоми може бути встановлений згідно мети. Наприклад, коли призначено, щоб доставити ліпосому у злоякісну тканину або запалену тканину шляхом EPR (поліпшена проникність і утримування) ін'єкції або подібно, переважно, щоб розмір частинок ліпосоми становив 30 - 400 нм, і більш переважно, щоб розмір частинок становив 50 - 200 нм. У випадку, коли намір полягає в тому, щоб доставити ліпосому до макрофага, переважно, щоб розмір частинок ліпосоми становив 30 - 1000 нм, і більш переважно, щоб розмір частинок становив 100 - 400 нм.

У випадку, коли ліпосомна композиція повинна використовуватися як пероральний препарат або трансдермальний препарат, розмір частинок ліпосоми може бути встановлений в декількох мікронах. Потрібно відзначити, що (1) у нормальній тканині судинні стінки служать бар'єрами (тому що судинні стінки складаються із щільно складених судинних ендотеліальних клітин), і

мікрочастинки, такі як супермолекули і ліпосома зазначеного розміру не можуть бути розподілені в межах тканини. Однак, у патологічній тканині, судинні стінки нещільні (тому що існують проміжки між судинними ендотеліальними клітинами), збільшена судинна проникність, і супермолекули і мікрочастинки можуть бути розподілені по екстравакулярній тканині (збільшена проникність). Крім того, (2) лімфатична система добре розвинена в нормальній тканині, але відомо, що лімфатична система не розвинена у патологічній тканині, і що супермолекули або мікрочастинки, одного разу включені, не рециркулюють через загальну систему, і утримуються у патологічній тканині (збільшене утримування) - це називають ефектом EPR (ППУ, поліпшена проникність і утримування)(Matsumura, Maeda, Cancer Research, (1986), 46: pp. 6387–6392). Отже, можливо контролювати фармакокінетику, регулюючи розмір частинок ліпосоми.

В даному винаході розмір частинок ліпосоми означає середньо-ваговий розмір частинок згідно способу динамічного розсіювання світла (спосіб квазіеластичного розсіювання світла). Тут показаний розмір частинок, обмірюваний приладами динамічного розсіювання світла (наприклад, модель Zetasizer Nano ZS, вироблена Malvern Instruments Ltd і ELS-8000, вироблена Otsuka Electronics Co., Ltd). Прилади вимірюють Броунівський рух частинок і розмір частинок визначається на основі встановленої методологічної теорії динамічного розсіювання світла.

Немає ніяких певних обмежень щодо розчинника внутрішньої фази ліпосоми, і можна навести, наприклад, буферні розчини, такі як фосфатний буферний розчин, цитратний буферний розчин, і буферизований фосфатом фізіологічний сольовий розчин, фізіологічний сольовий розчин, живильні середовища для культивування клітин, і т.і. Як розчинник, у випадку, коли використовується буферний розчин, переважно, що концентрація буферного агента становить 5-300 мМ і 10 - 100 мМ є більш переважною. Немає ніяких певних обмежень щодо рН внутрішньої фази ліпосоми, але 3 - 11 є переважним і 4 - 9 є більш переважним.

(Ліпосомна композиція )

Пропонується ліпосомна композиція згідно з даним винаходом. Ліпосомна композиція містить ліпосому і додатково містить ерибулін і т.і. у внутрішній фазі ліпосоми. Як згадано вище, ліпосомна композиція включає тверду форму і рідку форму. У випадку, коли ліпосома перебуває у твердій формі, вона може бути перетворена в рідку форму розчиненням або суспендуванням в запропонованому розчиннику, як описано нижче. У випадку, коли ліпосомна композиція є замороженою твердою речовиною, вона може бути перетворена у рідку форму шляхом танення при кімнатній температурі.

Ліпосомна концентрація і концентрація активної сполуки в ліпосомній композиції можуть бути відповідно встановлені згідно з призначенням ліпосомної композиції, препарату і т.і. У випадку, коли ліпосомна композиція є рідкою композицією, ліпосомна концентрація, як концентрація всіх ліпідів, що складають ліпосому, може бути встановлена від 0,2 до 100 мМ, і переважно 1-30 мМ. Концентрація (дозування) активної сполуки у випадку, коли ліпосомна композиція використовується як медикамент, описана нижче. Щодо кількості циклодекстрина в ліпосомній композиції переважним є те, що вона менше, ніж 0,1 моль еквівалент відносно ерибуліну і т.і., і більш переважним є те, що вона менше, ніж межа виявлення.

У ліпосомній композиції даного винаходу ерибулін і т.і. може бути розподілений у подвійному ліпідному шарі.

Немає ніяких певних обмежень щодо розчинника (дисперсійного середовища) ліпосомної композиції у випадку, коли ліпосомна композиція є рідкою композицією, і можна навести, наприклад, буферні розчини, такі як фосфатний буферний розчин, цитратний буферний розчин, і буферизований фосфатом фізіологічний сольовий розчин, фізіологічний сольовий розчин, і живильні середовища для культивування клітин. Немає ніяких певних обмежень щодо рН зовнішньої фази ліпосомної композиції, але 3 - 11 є переважним, і 4 - 9 є більш переважним.

Можна також додати наступні до ліпосомної композиції: моносахариди, такі як глюкоза, галактоза, маноза, фруктоза, інозитол, рибоза і ксилоза; дисахариди, такі як лактоза, сахароза, целобіоза, трегалоза, і мальтоза; трисахариди, такі як рафіноза і мелізитоза; полісахариди, такі як циклодекстрин; і цукрові спирти, такі як еритрит, ксиліт, сорбіт, маніт і мальтит; багатоатомні спирти, такі як гліцерин, дигліцерин, полігліцерин, пропіленгліколь, поліпропіленгліколь, етиленгліколь, діетиленгліколь, триетиленгліколь, поліетиленгліколь, моноалкільний етер етиленгліколю, моноалкільний етер діетиленгліколю, 1,3-бутиленгліколь. Можна також використовувати комбінації цукру і спирту.

З метою стабільного тривалого зберігання ліпосоми, яка диспергована в розчиннику (дисперсійне середовище) з погляду фізичної стабільності, включаючи коагуляцію і т.і., переважно видалити електроліт з розчинника (дисперсійного середовища) у максимально

можливого ступені. Крім того, з погляду хімічної стабільності ліпідів, переважно встановити рН розчинника (дисперсійного середовища) від кислого до приблизно нейтрального (рН 3,0-8,0) і вилучити розчинений кисень через азотне барботування.

Немає ніяких певних обмежень щодо концентрації цукру або багатоатомного спирту, що міститься в ліпосомній композиції, але у випадку, коли ліпосома диспергована в розчиннику, наприклад, переважно, що концентрація цукру становить 2 - 20 % (мас/об) і 5-10 % (мас/об) більш переважна. Щодо концентрації багатоатомного спирту, то концентрація 1-5 % (мас/об) є переважною і 2 - 2,5% (мас/об) є більш переважною. Ці розчинники можуть також використовуватися як зовнішня фаза ліпосоми в рідкій ліпосомній дисперсії, і заміщаючи або розбавляючи зовнішню фазу ліпосоми підготовчого розчину ліпосоми цими розчинниками, можливо замінити розчини зовнішньої фази ліпосоми на ці розчини.

Переважно, що тверді препарати ліпосомної композиції включають, наприклад, моносахариди, такі як глюкоза, галактоза, маноза, фруктоза, інозит, рибоза і ксилоза; дисахариди, такі як лактоза, сахароза, целобіоза, трегалоза і мальтоза; трисахариди, такі як рафіноза і мелізитоza; полісахариди, такі як циклодекстрин; і цукрові спирти, такі як еритрит, ксиліт, сорбіт, маніт і мальтит. Більш переважні суміші глюкози, лактози, сахарози, трегалози і сорбіту. Найбільш переважними є суміші лактози, сахарози, і трегалози. Це означає, що тверді препарати можуть стабільно зберігатися протягом тривалого періоду. Коли заморожені, переважно, що тверді препарати містять багатоатомні спирти (водні розчини) такі як гліцерин, дигліцерин, полігліцерин, пропіленгліколь, поліпропіленгліколь, етиленгліколь, діетиленгліколь, триетиленгліколь, поліетиленгліколь, моноалкільний етер етиленгліколю, моноалкільний етер діетиленгліколю і 1,3-бутиленгліколь. Щодо багатоатомних спиртів (водні розчини) гліцерин, пропіленгліколь і поліетиленгліколь є переважними, і гліцерин і пропіленгліколь є більш переважними. Це означає, що можливо стабільно зберігати тверду композицію тривалий період. Цукор і багатоатомні спирти можуть використовуватися в комбінації.

(Спосіб виробництва ліпосомної композиції)

Згідно з даним винаходом, наданий спосіб виробництва ліпосомної композиції, що містить ерибулін або його фармакологічно прийнятну сіль. Спосіб виробництва ліпосомної композиції включає: стадію, на якій надана рідка ліпосомна дисперсія, що містить ліпосому; стадію, на якій вищезгадану рідку ліпосомну дисперсію змішують з вищезгаданою активною сполукою (ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль); і стадію, на якій вищезгадану активну сполуку вводять у внутрішню фазу ліпосоми вищезгаданої рідкої ліпосомної дисперсії.

Переважно, що стадія, у якій одержують рідку ліпосомну дисперсію, що містить ліпосому, включає стадію, на якій одержують підготовчий розчин ліпосоми, і стадію, на якій заміщають або розбавляють зовнішню фазу ліпосоми вищезгаданого підготовчого розчину ліпосоми.

Підготовчий розчин ліпосоми може бути наданий, наприклад, готуючи ліпосому в розчині, що містить сіль амонію. Готуючи підготовчий розчин ліпосоми у розчині, що містить сіль амонію, можливо одержати рідку ліпосомну дисперсію, яка також містить сіль амонію у внутрішній фазі ліпосоми.

Немає ніяких певних обмежень щодо розчину, що містить сіль амонію, яка використовується при приготуванні підготовчого розчину ліпосоми і може використовуватися будь-який розчин, що містить сіль амонію.

Як сіль амонію, можна навести, наприклад, хлорид амонію, борат амонію, сульфат амонію, форміат амонію, ацетат амонію, цитрат амонію, тарtrat амонію, сукцинат амонію і фосфат амонію. Сульфат амонію, ацетат амонію, цитрат амонію, тарtrat амонію і фосфат амонію є переважними серед них; сульфат амонію, цитрат амонію і тарtrat амонію є більш переважними; і сульфат амонію є найбільш переважним.

Можна використовувати ці солі амонію в комбінаціях двох або більше.

Концентрація солі амонію в розчині, що містить сіль амонію, може бути відповідно встановлена згідно з кількістю інкапсульованого ерибуліну і т.і., і чим вище, тим краще; концентрація 10 мМ або більше є переважною; 20 мМ або більше є більш переважною; і 50 мМ або більше є найбільш переважною. Відносно рН розчину, що містить сіль амонію, рН 3-9 є переважним, 4-9 є більш переважним з погляду балансуєчого ступеня інкапсуляції і стабільності, і 5-8 є найбільш переважним.

Коригент рН може використовуватися, щоб коригувати рН розчину, що містить сіль амонію. Немає ніяких певних обмежень щодо концентрації індивідуальних коригентів рН в розчині, що містить сіль амонію, але 1-300 мМ є переважною, і 5-100 мМ є більш переважною.

Як коригент рН, можна навести, наприклад, амінокислоти, такі як аргінін, гістидин і гліцин; кислоти, такі як аскорбінова кислота, бензойна кислота, лимонна кислота, глутамінова кислота,

фосфорна кислота, оцтова кислота, пропіонова кислота, винна кислота, вугільна кислота, молочна кислота, борна кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, яблучна кислота, адипінова кислота, соляна кислота і сірчана кислота; солі вищезгаданих кислот, таких як сіль натрію, сіль калію і сіль амонію; і лужні сполуки (основа), такі як трис-гідроксиметиламінометан, аміачна вода (аміак), гідрид натрію і гідрид калію. Як коригент рН, гідрид натрію, соляна кислота, аміачна вода, оцтова кислота, молочна кислота, винна кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, і фосфорна кислота є переважними; гідрид натрію, аміачна вода, соляна кислота, оцтова кислота, лимонна кислота і фосфорна кислота є більш переважними; і гідрид натрію, аміачна вода, соляна кислота, лимонна кислота, і фосфорна кислота є найбільш переважними. Коригенти рН можуть використовуватися у вигляді комбінацій двох або більше солей амонію. Крім того, буферні розчини можуть також використовуватися як коригенти рН, такі як фосфатний буферний розчин, цитратний буферний розчин і буферизований фосфатом фізіологічний сольовий розчин.

Як підготовчий розчин ліпосоми, краще використовувати розчин, який одержаний шляхом приготування ліпосоми по суті без включення циклодекстрину. Як підготовчий розчин ліпосоми, внутрішня фаза ліпосоми може також містити сіль, кислоту, основу, та/або амінокислоту. У цьому випадку, переважно, що внутрішня фаза ліпосоми містить активну сполуку, сіль амонію, і кислоту. Як сіль амонію, сульфат амонію може бути наведений як переважний приклад; як кислота, лимонна кислота може бути наведена як переважний приклад.

Щодо виготовлення ліпосоми можна навести спосіб ліпідної плівки (вихровий спосіб), спосіб зворотно-фазового випарювання, ультразвуковий спосіб, спосіб попереднього пухирця, спосіб ін'єкції етилового спирту, спосіб французького віджиму, спосіб видалення холевої кислоти, Triton X-100 періодичний спосіб,  $\text{Ca}^{2+}$  спосіб сплавлення, спосіб етерної ін'єкції, спосіб нормалізації, спосіб заморожування-відтавання, і т.і.

Різні умови (кількості мембранних елементів, температури, і т.і.) при виготовленні ліпосоми можуть бути відповідно вибрані згідно способу виготовлення ліпосоми, призначення ліпосомної композиції, розміру частинок, і т.і. (див Op. cit, Kikuchi (1983), it.p.).

Розмір частинок ліпосоми може бути довільно пристосований в міру необхідності. Розмір частинок може бути пристосований, наприклад, здійснюючи екструзію (екструзійну фільтрацію) під високим тиском, використовуючи мембранний фільтр стандартного діаметра пори. Регулювання розмір частинок може бути проведене в будь-який період під час виробництва ліпосомної композиції даного винаходу. Наприклад, це може бути здійснене перед регулюванням зовнішньої фази ліпосоми в підготовчому розчині ліпосоми, після коригування зовнішньої фази ліпосоми в підготовчому розчині ліпосоми, або після введення активної сполуки у внутрішню фазу ліпосоми. Переважно здійснити пристосування розмір частинок перш, ніж увести активну сполуку у внутрішню фазу ліпосоми, і більш переважно провести це перш, ніж пристосувати зовнішню фазу ліпосоми в підготовчому розчині ліпосоми.

Рідка ліпосомна дисперсія може бути одержана, заміщаючи або розбавляючи зовнішню фазу одержаного підготовчого розчину ліпосоми. Заміщення або розбавлення зовнішньої фази ліпосоми може бути проведене однократно або комбінація різних типів способів заміщення або розбавлення можуть бути проведені багаторазово.

Як спосіб заміщення зовнішньої фази ліпосоми підготовчого розчину ліпосоми, можна навести діаліз, центрифугування і гель-фільтрацію. Заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми, даний винахід може бути здійснений так, щоб зовнішня фаза ліпосоми по суті не містила сіль амонію або циклодекстрин. Крім того, заміщаючи або розбавляючи зовнішню фазу ліпосоми, можливо ефективно інкапсулювати ерибулін або його фармакологічно прийнятну сіль у внутрішню фазу ліпосоми.

Діаліз може бути проведений, наприклад, використовуючи діалізну мембрану. У якості діалізної мембрани можна навести мембрану з відсіченою молекулярною масою, такою як целюлозна туба або Spectra/Por.

Щодо центрифугування, відцентрове прискорення може бути проведене переважно до 100 г або більше, і більш переважно до 300 г або більше. Заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми центрифугуванням, можна також регулювати концентрацію ліпосоми в поєднанні із заміщенням зовнішньої фази ліпосоми.

Гель-фільтрація може бути виконана, наприклад, проводячи фракціонування на основі молекулярної маси, використовуючи колонку, таку як Sephadex або Sepharose.

Як розчинник (дисперсійне середовище), використовуваний для заміщення та/або розбавлення зовнішньої фази ліпосоми, можна навести, наприклад, розчин сахарози, сольовий розчин і живильне середовище для культивування клітин. При використанні цих розчинників можливо одержати стабільну композицію ліпосоми.

Немає ніяких певних обмежень щодо рН згадуваного розчинника, але діапазон 2 - 11 може бути встановлений; 3 - 10 є переважним, 6-10 є більш переважним, і 7 - 10 є найбільш переважним. Як описано нижче, градієнт рН може використовуватися, щоб ввести ерибулін і т.і. у внутрішню фазу ліпосоми. У цьому випадку, рН розчинника може бути встановлений так, щоб зовнішня фаза ліпосоми досягала цільового рН.

Коригент рН може використовуватися, щоб коригувати рН згадуваного розчинника. Немає ніяких певних обмежень щодо використовуваної концентрації, але 1-300 мМ є переважною, і 5-100 мМ є більш переважною.

Як коригенти рН, можна навести, наприклад, амінокислоти, такі як аргінін, гістидин, і гліцин; кислоти, такі як аскорбінова кислота, бензойна кислота, лимонна кислота, глутамінова кислота, фосфорна кислота, оцтова кислота, пропіонова кислота, винна кислота, вугільна кислота, молочна кислота, борна кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, яблучна кислота, адипінова кислота, соляна кислота, і сірчана кислота; солі вищезгаданих кислот, такі як сіль натрію, сіль калію, і сіль амонію; і лужні сполуки, такі як трис-гідроксиметиламінометан, аміачна вода, гідрид натрію і гідрид калію. Гідрид натрію, соляна кислота, гістидин, винна кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота і фосфорна кислота є переважними; гідрид натрію, соляна кислота, гістидин, винна кислота, лимонна кислота, і фосфорна кислота є більш переважними; і гідрид натрію, соляна кислота, гістидин і фосфорна кислота є найбільш переважними.

Щоб поліпшити ступінь інкапсуляції ерибуліну або його фармакологічно допустимої солі в ліпосомі, ступінь інкапсуляції може бути збільшений, додаючи розчин (сольовий розчин), що містить електроліт до зовнішньої фази ліпосоми, щоб збільшити іонну інтенсивність. Немає ніяких певних обмежень щодо електроліту (солі), що міститься в зовнішній фазі ліпосоми, але хлорид натрію і хлорид калію переважні, і хлорид натрію більш переважний. Фізіологічний сольовий розчин може також використовуватися. Крім того, як зовнішня фаза ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії або подібних, цукор, електроліт та/або амінокислота можуть бути включені, і цукор або електроліт і амінокислота також можуть бути включені. Як цукор, сахароза може бути наведена як переважний приклад; як електроліт, фізіологічний сольовий розчин і хлорид натрію можуть бути наведені як переважні приклади; і, як амінокислота, гістидин може бути наведений як переважний приклад.

Переважно, що одержана рідка ліпосомна дисперсія по суті не містить циклодекстрин або сіль амонію у зовнішній і внутрішній фазах ліпосоми, але в даному винаході ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль можуть бути введені у внутрішню фазу ліпосоми навіть у випадку, коли сіль циклодекстрина або амонію була з деяких причин додана до зовнішньої фази ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії, і навіть, коли зовнішня фаза ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії містить сіль амонію або циклодекстрин.

Щодо концентрації ліпідів у рідкій ліпосомній дисперсії, 1-100 мМ є переважною і 1-50 мМ є більш переважною. У межах цих діапазонів можливо відповідно утворювати більшу кількість ліпосомних частинок без погіршення фізичних властивостей рідкої ліпосомної дисперсії.

Ліпосомна композиція може бути одержана, змішуючи одержану рідку ліпосомну дисперсію і активну сполуку ерибулін і т.і., і вводячи активну сполуку у внутрішню фазу ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії. Переважно, що стадія введення включає стадію, на якій мембранна проникність ліпосоми збільшена в змішаному розчині рідкої ліпосомної дисперсії і активної сполуки. Це означає, що інкапсуляція ерибуліну і т.і. у ліпосому може бути досягнута за більш короткий проміжок часу. Однак, навіть, якщо не проводяться певні операції з метою посилення мембранної проникності ліпосоми після змішування рідкої ліпосомної дисперсії і ерибуліну і т.і., можливо інкапсулювати ерибулін і т.і. у ліпосому, якщо необхідно.

У стадії, у якій змішують ерибулін або його фармакологічно прийнятну сіль, можливо використовувати речовину, розчинену в розчиннику або тверду речовину як ерибулін і т.і. Немає ніяких певних обмежень щодо розчинника і можна використовувати, наприклад, речовину, ідентичну зовнішній фазі ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії.

На вибір у міру необхідності, можливо використовувати градієнт рН при введенні ерибуліну і т.і. у внутрішню фазу ліпосоми. У цьому випадку, відносно рН внутрішньої фази ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії, рН 3-9 є переважним, рН 4-9 є більш переважним і рН 5-8 є найбільш переважним.

Крім того, можливо встановити рН зовнішньої фази ліпосоми вище, чим рН внутрішньої фази ліпосоми, щоб створити градієнт рН. Градієнт рН 1-5 є переважним і 2- 3 є більш переважним.

Крім того, можливо збільшити ступінь інкапсуляції в ліпосому, доводячи рН зовнішньої фази ліпосоми приблизно до рКа ерибуліну і т.і., від 7,5 до 12,5 є переважним, від 8,5 до 11,5 є більш переважним, і від 9 до 10,5 є найбільш переважним (рКа мезилату ерибуліну 9,6).

5 Як підготовчий розчин ліпосоми, є оптимальним використання розчину, який одержаний шляхом приготування ліпосоми по суті без включення циклодекстрину.

Як спосіб посилення мембранної проникності ліпосоми в одержаному змішаному розчині, можна навести спосіб нагрівання змішаного розчину, спосіб додавання мембранного флюїдизатора до змішаного розчину, і т.і.

10 У випадку, коли змішаний розчин нагрівають, активна сполука може взагалі бути більш ефективно введена у внутрішню фазу ліпосоми, нагріваючись до більш високих температур. Зокрема, переважно встановити температуру нагрівання виходячи із стабільності активної сполуки і використовуваних компонентів ліпосомної мембрани. Зокрема, переважно, що температура нагрівання встановлена приблизно до температури фазового переходу

15 "Температура фазового переходу" двошарової ліпідної мембрани ліпосоми означає температуру, при якій починається поглинання тепла (температура, при якій починається ендотермічна реакція) при диференційному термоаналізі при високотемпературних умовах. Диференційний термоаналіз є способом, що дозволяє аналізувати теплофізичні властивості зразків, вимірюючи різницю температур зразка або еталона як функцію часу або температури, змінюючи температуру зразка або еталона. У випадку, коли диференційний термоаналіз

20 проводиться щодо компонентів ліпосомної мембрани, компоненти ліпосомної мембрани зріджуються при збільшенні температури і спостерігається ендотермічна реакція.

Як широко відомо у цій технічній галузі, температурний діапазон, при якому спостерігається ендотермічна реакція значно змінюється залежно від компонентів ліпосомної мембрани. Наприклад, у випадку, коли компоненти ліпосомної мембрани складаються із чистих ліпідів, температурний діапазон, у якому спостерігається ендотермічна реакція, є надзвичайно вузьким, і ендотермічна реакція часто спостерігається в межах діапазону  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  щодо ендотермічної пікової температури. З іншого боку, у випадку, коли компоненти ліпосомної мембрани складаються з різноманітних ліпідів, і особливо у випадку, коли компоненти ліпосомної

30 мембрани складаються з ліпідів, одержаних із природних матеріалів, температурний діапазон, у якому спостерігається ендотермічна реакція, має тенденцію розширюватися, і ендотермічна реакція спостерігається, наприклад, у межах діапазону  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  щодо ендотермічної пікової температури (тобто, спостерігається широкий пік, і т.і.). Згідно з даним винаходом, вважається, що зрідження ліпосомної мембрани збільшується і мембранна проникність активної сполуки збільшується при збільшенні температури вище температури фазового переходу двошарової ліпідної мембрани ліпосоми.

Наприклад, хоча є залежність від термостабільності і т. д. активної сполуки і використовуваних компонентів ліпосомної мембрани, переважно мати температурний діапазон від температури фазового переходу двошарової ліпідної мембрани ліпосоми до  $+20^{\circ}\text{C}$  температури фазового переходу; температурний діапазон від температури фазового переходу до  $+10^{\circ}\text{C}$  температури фазового переходу є більш переважним; і температурний діапазон від  $+5^{\circ}\text{C}$  температури фазового переходу до  $+10^{\circ}\text{C}$  температури фазового переходу є найбільш переважним.

Температура нагрівання є звичайно від 20 до  $100^{\circ}\text{C}$ ; від 40 до  $80^{\circ}\text{C}$  є переважною; і від 45 до  $65^{\circ}\text{C}$  є більш переважною.

Зокрема, у випадку ліпосомної мембрани, основними інгредієнтами якої є дипальмітоїл фосфатидилхолін (температура фазового переходу як чистої речовини:  $41^{\circ}\text{C}$ ) і холестерин, хоча це також залежить від цієї композиції, температура нагрівання від 40 до  $60^{\circ}\text{C}$  є звичайно переважною і від 45 до  $50^{\circ}\text{C}$  є більш переважною. Крім того, у випадку ліпосомної мембрани, основні інгредієнти якої є гідрований фосфатидилхолін сої (HSPC; температура фазового переходу як чистої речовини: від 50 до  $60^{\circ}\text{C}$ ) і холестерин, хоча це також залежить від цієї композиції, температура нагрівання від 50 до  $70^{\circ}\text{C}$  є звичайно переважною і від 55 до  $65^{\circ}\text{C}$  є більш переважною. Однак, ці температури нагрівання жодним чином не обмежують даний винахід.

55 У стадії нагрівання немає ніяких певних обмежень щодо часу, при якому температура підтримується на рівні або вище температури фазового переходу і цей період може бути належним чином встановлений в межах діапазону, наприклад, від декількох секунд до 30 хвилин. Враховуючи термостабільність активної сполуки і ліпідів так само як ефективно серійне виробництво, бажано провести обробку в межах короткого часу. Таким чином, переважно, що

60 період підтримування підвищеної температури становить 1-30 хвилин, і від 2 хвилин до 5

хвилин є більш переважним. Однак, ці періоди підтримування температури жодним чином не обмежують даний винахід.

Крім того, як зазначено вище, також можливо підсилити проникність ліпосомної мембрани, додаючи мембранний флюїдизатор до одержаного змішаного розчину (тобто, додаючи його до зовнішньої фази ліпосом). Як мембранний флюїдизатор, можна навести органічні розчинники, поверхнево-активні речовини, ферменти, і т.і. які розчинні у водних розчинниках. Більш конкретно, як органічні розчинники, можна навести, наприклад, одноатомні спирти, такі як етиловий спирт і бензиловий спирт; багатоатомні спирти, такі як гліцерин і пропіленгліколь; апротонні полярні розчинники, такі як диметилсульфоксид (ДМСО). Як поверхнево-активні речовини, можна навести, наприклад, аніонні поверхнево-активні речовини, такі як натрієва сіль жирної кислоти, моноалкілсульфат і моноалкілфосфат; катіонні поверхнево-активні речовини, такі як сіль алкілтриметил амонію; амфолитні поверхнево-активні речовини, такі як оксид алкілдиметиламіну; і неіонні поверхнево-активні речовини, такі як алкілтер поліоксуетилену, алкілмоногліцериновий етер і сорбітановий естер жирної кислоти. Як ферменти, можна навести, наприклад, холінестеразу і холестериноксидазу. Фахівці можуть встановити кількість мембранного флюїдизатора згідно композиції компонентів ліпосомної мембрани, мембранного флюїдизатора і т.і., і враховуючи ступінь ефективності інкапсуляції активної сполуки внаслідок додавання мембранного флюїдизатора, стабільності ліпосом і т.і.

Спосіб виробництва ліпосомної композиції даного винаходу може включати стадію коригування рН зовнішньої фази ліпосом одержаної ліпосомної композиції після вищезгаданої стадії введення.

РН зовнішньої фази, який підлягає коригуванню, особливо не обмежений, але може бути переважно 4 - 10, більш переважно 5-9, і найбільш переважно нейтральним 6 - 8 з погляду хімічної стабільності фосфоліпиду, що складає ліпосому.

Крім того, стадія висушування одержаної ліпосомної композиції може бути додатково включена.

Таким чином, використовуючи ліпосомну композицію як рідку композицію, ліпосомна композиція в рідкій формі, одержана у вищезгаданій стадії введення, може використовуватися без модифікації як заключна ліпосомна композиція, або зовнішня фаза ліпосом в рідкій ліпосомної композиції, одержаній у вищезгаданій стадії введення, може бути пристосована (заміщена, і т.і.), щоб одержати заключну ліпосомну композицію. Роблячи так, коригування зовнішньої фази ліпосом може бути виконане аналогічно до коригування зовнішньої фази ліпосом в підготовчому розчині ліпосом. У випадку, коли ліпосомна композиція є рідкою композицією, вона може використовуватися без подальшої модифікації.

Крім того, у випадку, коли ліпосомна композиція повинна бути перетворена у твердий препарат, рідка ліпосомна композиція, одержана у вищезгаданій стадії введення, може бути висушена, щоб одержати заключну тверду ліпосомну композицію. Ліофілізація і висушування розпиленням можуть бути наведені як приклади способів висушування ліпосомної композиції. У випадках, коли ліпосомна композиція є твердим препаратом, він може бути розчинений або суспендований в прийнятному розчиннику і використовуватися як рідка композиція. Розчинник для використання може бути відповідно вибраний згідно з метою використання і т.і. для ліпосомної композиції, і у випадку використання ліпосомної композиції як ін'єкційного продукту, наприклад, розчинник є переважно стерильною дистильованою водою. У випадку використання ліпосомної композиції як медикамента, лікар або пацієнт можуть ін'єкувати розчинник у флакон з інкапсульованим твердим препаратом, наприклад, щоб одержати препарат під час застосування. У випадку, коли рідка ліпосомна композиція є замороженим твердим препаратом, він може використовуватися як рідка композиція, зберігаючи в замороженому стані, і повернутий до рідкого стану шляхом танення при кімнатній температурі або швидкого плавлення при нагріванні під час застосування.

(Фармацевтичні композиції і т.і.)

Ліпосомна композиція даного винаходу може використовуватися як лікарський засіб в медичній галузі. Зокрема, ліпосомна композиція даного винаходу може використовуватися як протипухлинна фармацевтична композиція.

У випадку, коли ліпосомна композиція даного винаходу використовується як фармацевтична композиція, ліпосомну композицію можна призначати ін'єкційно (внутрішньовенна, внутрішньоартеріальна, або місцева ін'єкція), орально, назально, підшкірно, інгаляційно або у вигляді очних крапель і конкретно локальною ін'єкцією до цільової групи клітин або органа, або іншою такою ін'єкцією переважно як доповнення до внутрішньовенної ін'єкції, підшкірної ін'єкції, інтрадермальної ін'єкції і інтраартеріальної ін'єкції.

Таблетка, порошок, гранули, сироп, капсула, рідина, і т.п. можуть бути дані як приклади лікарських форм ліпосомної композиції у випадку перорального призначення. Ін'єкційні форми, крапельні ін'єкційні форми, очні краплі, мазь, супозиторій, суспензія, припарка, лосьйон, аерозоль, пластрин і т.п. можуть бути дані як приклади сполук ліпосомної композиції у випадку

5 неперорального введення, і ін'єкційні форми і інфузійні агенти особливо переважні.

Дозування фармацевтичної композиції помітно відрізняється залежно від типу захворювання, типу активної сполуки, так само як віку, статі і ваги пацієнта, серйозності симптомів, поряд з іншими факторами, але звичайно, щоденне дозування ерибуліну або його фармакологічно допустимої солі для дорослих особливо не обмежене, хоча ерибуліну мезилат,

10 який є прийнятною сіллю, є звичайно від 0,1 до 10 мг. Крім того, дозування може бути розподілене на більше, чим одну дозу на добу. Ліпосомну композицію, яка містить, наприклад, 0,01-300 мг/мл ерибуліну або його фармакологічно прийнятну сіль у внутрішній фазі ліпосоми можна призначати як ліпосомну композицію даного винаходу.

(Набір)

15 Згідно з даним винаходом, набір наданий для виготовлення ліпосомної композиції. Набір може використовуватися для виготовлення ліпосомної композиції як медикамента, який може використовуватися лікарем у клініці або пацієнтом.

Набір включає ліпосомний реагент. Ліпосомний реагент може бути або твердою, або рідкою формою. Якщо ліпосомний реагент перебуває в рідкій формі, вищезгадана рідка ліпосомна дисперсія може використовуватися як ліпосомний реагент. Крім того, якщо ліпосомний реагент перебуває у твердій формі, ліпосомний реагент може бути розчинений або суспендований у відповідному розчиннику, щоб одержати рідку ліпосомну дисперсію, і вищезгадана рідка ліпосомна дисперсія може бути висушена, щоб одержати ліпосомний реагент. Висушування може бути виконане аналогічно до вищезгаданого висушування ліпосомної композиції.

25 Використовуючи набір, якщо ліпосомний реагент перебуває у твердій формі, ліпосомний реагент може бути розчинений або суспендований у відповідному розчиннику, щоб одержати рідку ліпосомну дисперсію. Роблячи так, розчинник є подібним зовнішній фазі ліпосоми у вищезгаданій рідкій ліпосомній дисперсії.

Набір даного винаходу додатково містить ерибулін або його фармакологічно прийнятну сіль (мезилат ерибуліну є прийнятною сіллю). Ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль можуть бути або у твердій, або у рідкій формі (розчинені або суспендовані у розчиннику). Використовуючи набір, якщо ерибулін або подібні перебувають у твердій формі, переважно, що вони розчинені або суспендовані у відповідному розчиннику, щоб одержати рідку форму. Розчинник може бути відповідно підібраний згідно з фізичними властивостями і т.п. ерибуліну або подібних, і може бути утворений подібно зовнішній фазі ліпосоми у вищезгаданій дисперсійній рідині, наприклад. Набір даного винаходу може включати іншу активну сполуку, чим ерибулін або її фармакологічно прийнятну сіль.

У наборі ліпосомний реагент і активна сполука можуть бути упаковані окремо, або вони можуть бути у твердих формах і змішані разом.

40 У випадку, коли ліпосомний реагент перебуває у твердій формі, крім випадків розчинення або суспендування, щоб утворювати рідку ліпосомну дисперсію як вище, набір може використовуватися у здійснюваній стадії, подібній змішуванню рідкої ліпосомної дисперсії і активної сполуки, і введенню активної сполуки у внутрішню фазу ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії у способі виробництва вищезгаданої ліпосомної композиції.

45 Таким чином можливо одержати ліпосомну композицію, у якій активна сполука введена в внутрішню фазу ліпосомного реагенту.

У випадку, коли ліпосомний реагент і активна сполука є у твердих формах і упаковані разом, суміш ліпосомного реагенту і активної сполуки відповідно розчинена або суспендована в розчиннику. Роблячи так, розчинник є подібним зовнішній фазі ліпосоми у вищезгаданій рідкій ліпосомній дисперсії. Таким чином можливо утворювати стан, при якому змішані рідка ліпосомна дисперсія і активна сполука, використання яких можливе після здійснення інших стадій введення активної сполуки у внутрішню фазу ліпосоми рідкої ліпосомної дисперсії у способі виробництва вищезгаданої ліпосомної композиції.

Втілення

55 Даний винахід конкретно описаний наведеними втіленнями і порівняльними прикладами, але не обмежується втіленнями, наведеними нижче.

(Втілення 1)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

60 396,4 мг сульфату амонію і 189,1 мг моногідрату лимонної кислоти розчиняли в чистій воді, і розбавляли до 15 мл, щоб одержати 200 мМ сульфат амонію/60 мМ водна лимонна кислота.

Після пристосування 2,5 мл 200 мМ сульфат амонію/60 мМ водна лимонна кислота з водним аміаком до рН 5,5, водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми розбавляли до 5 мл очищеною водою.

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

- 5 Після розчинення 317,9 мг гідрованого соєвого фосфатидилхоліну (виробництва Lipoid), 116,0 мг холестерину (виробництва Sigma) і 130,4 мг поліетиленгліколю 2000-фосфатидилетаноламіну (виробництва Genzyme, МПЕГ 2000-дистеароїл фосфатидилетаноламін) в 10 мл хлороформу, це точно розподіляли в три пробірки, після чого хлороформ з однієї пробірки видаляли під зниженим тиском в роторному випаровувачі, щоб утворити ліпідну плівку. 5 Мл водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми нагрівали приблизно до 60 °С і додавали до одержаної ліпідної плівки, і перемішували, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми. Після обробки підготовчого розчину ліпосоми ультразвуковими хвилями протягом 20 хвилин, гранулювали на екструдері (виробництва Lipex Biomembranes), нагрівали приблизно до 65 °С, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми. Розмір частинок ліпосоми в одержаному підготовчому розчині ліпосоми визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і все становило 90 - 100 нм.

<Одержання рідкої ліпосомної дисперсії>

- 20 Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (рН = 7,6), заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину. Після заміщення зовнішньої фази ліпосоми центрифугували протягом 30 хвилин при 400 × g. Після центрифугування це повторно диспергували і 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину використовували, щоб одержати об'єм 5 мл, отримуючи таким чином рідку ліпосомну дисперсію.

<Одержання розчину активної сполуки>

- 25 Розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, щоб одержати 1 мг/мл мезилату ерибуліну.

<Одержання ліпосомної композиції >

- 30 0,5 мл рідкої ліпосомної дисперсії і 0,5 мл розчину мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині і інкубували протягом 3-х хвилин у воді 55 °С, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми.

<Визначення ступеня інкапсуляції >

Ступінь інкапсуляції визначали як описано нижче.

- 35 Ліпосомну композицію з інкапсульованою активною сполукою ультрацентрифугували протягом 30 хвилин при 400 × g. Концентрацію активної сполуки у фільтраті визначали ВЕРХ, визначаючи кількість активної сполуки, неінкапсульованої в ліпосоми. Ступінь інкапсуляції розраховували, використовуючи формулу нижче.

(Формула 1)

- 40 Ступінь інкапсуляції (%) = Кількість активної сполуки у загальній кількості (мг) – Кількість активної сполуки у фільтраті після ультрацентрифугування (мг) / Кількість активної сполуки у загальній кількості (мг) X 100

Ступінь інкапсуляції мезилату ерибуліну становив 90,9 %.

(Втілення 2)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

- 45 Аналогічно втіленню 1, 264,3 мг сульфату амонію і 126,1 мг моногідрату лимонної кислоти розчиняли в чистій воді, і використовували мірну колбу, щоб розбавити це до 10 мл, щоб одержати 200 мМ сульфат амонію/60 мМ водна лимонна кислота. Із цього брали 1 мл і доводили до рН 5,5 аміачною водою, після чого розбавляли чистою водою до 2 мл, щоб одержати водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми.

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

- 50 80 мг кожної ліпідної суміші (гідрований фосфатидилхолін сої: холестерин: поліетиленгліколь 2000-фосфатидилетаноламін=58,6:19,2:22,2 (по масі)), зважували, 2 мл водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми нагрівали приблизно до 80 °С і додавали туди і перемішували, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми. Цей підготовчий розчин ліпосоми гранулювали, використовуючи екструдер (виробництва Lipex Biomembranes), нагрівали приблизно до 80 °С, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми.

<Одержання рідкої ліпосомної дисперсії>

Одержаний підготовчий розчин ліпосоми розбавляли до 10 мл 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (рН = 7,6), і центрифугували протягом 30 хвилин при 400 × g. Після центрифугування фільтрат видаляли. Осад ресуспандували із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний

розчин гістидину, і використовували мірну колбу, щоб отримати 1 мл рідини, одержуючи рідку ліпосомну дисперсію.

<Одержання розчину препарату>

Мезилат ерибуліну (мезилат ерибуліну) розчиняли у 0,9 % хлорид натрію/10мМ водний розчин гістидину і одержували 5 мг/мл розчину мезилату ерибуліну.

<Одержання ліпосомної композиції>

0,96 мл рідкої ліпосомної дисперсії і 0,24 мл розчину мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині і інкубували протягом 3-х хвилин у воді 60°C, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми.

<Стабільність у плазмі крові пацюка>

0,2 мл одержаного мезилату ерибуліну, інкапсульованого у ліпосоми і 1,8 мл плазми крові пацюка змішували і струшували при 37 °С, використовуючи термостат рідкої фази. Негайно після одержання, взяття зразків здійснювали через 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин і через 72 години після початку струшування і залишкову кількість мезилату ерибуліну у ліпосомах визначали ВЕРХ.

Результати вимірювань показані на Фіг. 1. Як видно з Фіг. 1, це було позначено, що мезилат ерибуліну стабільно утримувався у плазмі крові довше, чим 120 годин і поетапне вивільнення було можливе.

(Втілення 3)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

264,3 мг сульфату амонію і 126,1 мг моногідрату лимонної кислоти розчиняли в чистій воді, щоб одержати приблизно 15 мл. Після пристосування рН до 7,0 з водним гідроксидом натрію, розбавляли із чистою водою до 20 мл, щоб одержати водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми ( 100 мМ сульфат амонію/30 мМ лимонна кислота).

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

378 мг ліпідної суміші (гідрований фосфатидилхолін сої:холестерин: поліетиленгліколь 2000-фосфатидилетаноламін=58,6:19,2:22,2 ( по масі)) зважували, 10 мл вищезгаданого водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми нагрівали приблизно до 80 °С і додавали туди і перемішували, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми. Цей підготовчий розчин ліпосоми гранулювали, використовуючи екструдер (виробництво Lipex Biomembranes) забезпечений 50 нм полікарбонатним мембранним фільтром і нагрівали до приблизно 80 °С, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми з розміром частинок приблизно 80 нм.

<Одержання рідкої ліпосомної дисперсії>

Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (рН = 7,6), заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину. Після заміщення зовнішньої фази ліпосоми центрифугували протягом 30 хвилин при 400 × g. Після центрифугування повторно диспергували з 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (рН = 7,6) і 10 мл розчину розбавляли до 10 мл, щоб одержати рідку ліпосомну дисперсію.

<Одержання розчину препарату>

Розчин мезилату ерибуліну розчиняли з 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (рН = 7,6), і одержували 5 мг/мл розчину мезилату ерибуліну.

<Одержання ліпосомної композиції>

9,6 мл рідкої ліпосомної дисперсії і 1,2 мл розчину мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині і використовували гідроксид натрію для коригування рН до 9,5. Інкубували протягом 3-х хвилин у воді 60°C, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми. Після охолодження використовували хлорид, щоб коригувати рН до 7,5. Аналогічно втіленню 1, визначений ступінь інкапсуляції становив 99 %.

(Втілення 4)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

Аналогічно втіленню 1, одержували 100 мМ сульфат амонію/30 мМ лимонна кислота (рН = 5,5).

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

Гідрований фосфатидилхолін сої, холестерин і поліетиленгліколь 2000-фосфатидилетаноламін були зважені згідно з кількостями, наведеними в Таблиці 1 нижче. Після розчинення кожного в 3 мл хлороформу, хлороформ видаляли під зниженими тиском в роторному випаровувачі, щоб утворити ліпідну плівку. 10 мл готового водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми нагрівали приблизно до 80 °С і додавали до одержаної ліпідної плівки і перемішували, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми. Потім це гранулювали,

використовуючи екструдер (виробництво Lipex Biomembranes), нагрівали приблизно до 80 °С, щоб одержати гранульовану підготовчу рідину ліпосоми.

- Розмір частинок ліпосом в одержаному підготовчому розчині ліпосоми визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і Rp.1 становив 77 нм, Rp. 2 - 95 нм, Rp.3 - 79 нм, і Rp.- 4 128 нм.

Таблиця 1

Rp.	Гідрований фосфатидилхолін сої	Холестерин	Поліетиленгліколь 2000-фосфатидилетаноламін
1	234 мг	76 мг	15 мг
2	234 мг	76 мг	15 мг
3	222 мг	73 мг	87 мг
4	222 мг	73 мг	87 мг

<Одержання ліпосомної композиції >

- Аналогічно втіленню 1, одержували рідку ліпосомну дисперсію. Крім того, розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, і одержували 5 мг/мл мезилату ерибуліну.

- 4,8 мл кожної рідкої дисперсії ліпосоми і 0,6 мл розчину мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляних посудинах, які інкубували протягом 3-х хвилин у воді 60°C, щоб одержати ліпосомні композиції з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми. 24,6 Мл 0,9 % хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину додавали до кожної ліпосомної композиції і 0,22 мкм полівініліденфторидний (PVDF) фільтр використовували для фільтрування і стерилізації, одержуючи зразок призначення (концентрація мезилату ерибуліну : 0,1 мг/мл).

Аналогічно втіленню 1, визначений ступінь інкапсуляції становив принаймні 90 % у кожному із приписань.

- Безтимусні миші-самки (NU/NU, Charles River Laboratories Japan, Inc) були підшкірно інокульовані LOX клітинами людської меланоми і через 11 або 12 днів зразки вводили у хвостові вени 10 мл/кг (1,0 мг/кг мезилату ерибуліну). Бнали зразок крові, і тканинний екстракт пухлини вводили кардіальною пункцією у фіксовані періоди після введення (15 хвилин, 30 хвилин, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, і 48 годин) (n = 3). Кров збирали у пробірки, що містять гепарин, і через 30 хвилин після збирання кров сепарували центрифугуванням при 1500 × g протягом 10 хвилин при 4 °С, одержуючи плазму крові. Усю тканину пухлини екстрагували, промивали з PBS, і витирали водно-абсорбуючим папером і потім тканину негайно зважували і реєстрували. Тканину поміщали в пробірку і охолоджували у крижаній воді, і потім зберігали при -80 °С, поки аналіз не був виконаний.

- Мезилат ерибуліну у плазмі крові і у тканині пухлини визначали, використовуючи рідинну хроматографію з мас-спектрометрією (PX/MC/MC).

- Фармакокінетичні параметри обчислювали, використовуючи програмне забезпечення аналізу некомпартментної моделі (версія 5,0,1 WinNonlin). Результати фармакокінетичних параметрів у плазмі крові і фармакокінетичних параметрів у тканині пухлини мезилату ерибуліну показані відповідно в Таблиці 2 і Таблиці 3.

Таблиця 2

Рр. 1–4 і фармакокінетичні параметри мезилату ерибуліну у плазмі крові мишей-носіїв LOX раку

Приписання	AUC <sub>0-1</sub> (нг·год/мл)	AUC <sub>0-∞</sub> (нг·год/мл)	CL (мл/год/кг)	Vss (мл/кг)	t <sub>1/2</sub> (год)	MRT (год)	Співвідношення 1
Rp. 1	253049	258274	3,87	43,99	8,7	11,4	707,1
Rp. 2	176148	177893	5,62	56,40	6,8	10,0	487,0
Rp. 3	228151	233067	4,29	48,93	8,4	11,4	638,1
Rp. 4	221494	230541	4,34	55,88	9,4	12,9	631,2
Мезилат ерибуліну	363,02	365,247	2420	8032	3,7	3,3	1,0

$$\text{Співвідношення 1} = \text{AUC}_{\text{ліпосоми у плазмі}} / \text{AUC}_{\text{мезилату ерибуліну у плазмі}}$$

Таблиця 3

Рр. 1-4 і фармакокінетичні параметри мезилату ерибуліну у плазмі крові мишей-носіїв LOX раку

Приписання	C <sub>[Макс]</sub> (нг/г)	T <sub>[Макс]</sub> (год)	AUC <sub>0-1</sub> (нг·год/мл)	AUC <sub>0-∞</sub> (нг·год/мл)	t <sub>1/2</sub> (год)	MRT (год)	TPI (мл/г)	Співвідно- Шення 2
Рр. 1	692,1	4,0	24960,7	34581,8	22,8	38,8	0,13	5,5
Рр. 2	1002,9	8,0	16759,6	22301,1	22,2	34,5	0,13	3,5
Рр. 3	3965,7	12,0	41643,7	46297,3	16,1	23,3	0,20	7,4
Рр. 4	1132,8	12,0	28377,4	45005,6	23,7	44,3	0,20	7,2
Мезилат ерибуліну	323,425	0,25	4649,521	6294,283	17,8	27,7	17,23	1,0

Співвідношення 2 = AUC<sub>ліпосоми у пухлині</sub>/AUC<sub>мезилату ерибуліну у пухлині</sub>

Із Таблиці 2 і Таблиці 3 можна помітити, що AUC плазми крові і тканини пухлини збільшена у порівнянні з вільним мезилатом ерибуліну у всіх чотирьох ліпосомних композиціях Рр. 1-4, і тому, кількість міграції пухлини і утримування мезилату ерибуліну поліпшені.

5 (Втілення 5)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

Аналогічно втіленню 1, одержували 100 мМ сульфат амонію/30 мМ водна лимонна кислота (pH = 5,5).

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

10 Зважували 221,8 мг гідрованого соєвого фосфатидилхоліну, 72,5 мг холестерину і 86,9 мг поліетиленгліколю 2000-фосфатидилетаноламіну. Після розчинення їх в 3 мл хлороформу, хлороформ видаляли під зниженими тиском в роторному випаровувачі, і утворювали ліпідну плівку. 10 Мл створеного водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми нагрівали приблизно до 80 °С і додавали до одержаної ліпідної плівки і перемішували, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми. Потім це гранулювали, використовуючи екструдер (виробництво Lipex Biomembranes), нагрівали приблизно до 80°C, і одержували гранульований підготовчий розчин ліпосоми. Розмір частинок ліпосом в одержаному підготовчому розчині ліпосоми визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і він становив приблизно 90 нм.

<Одержання рідкої ліпосомної дисперсії>

20 Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,6), заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину. Після заміщення зовнішньої фази ліпосоми центрифугували протягом 30 хвилин при 400 × g. Після центрифугування повторно диспергували і 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину використовували, щоб одержати 10 мл рідини, створюючи рідку ліпосомну дисперсію.

<Одержання розчину препарату>

30 Розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, і одержували 1 мг/мл розчину мезилату ерибуліну. Крім того, як зразки введення вільних речовин, розчин мезилату ерибуліну розбавляли із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, і 0,22 мкм PVDF фільтр використовували для фільтрування і стерилізації, щоб одержати зразки введення (концентрація мезилату ерибуліну: 0,3 мг/мл і 0,4 мг/мл).

<Одержання ліпосомної композиції>

35 1,8 мл рідкої ліпосомної дисперсії і 1,2 мл розчину мезилату ерибуліну кожний змішували в 10 мл скляній посудині, яку інкубували протягом 3-х хвилин у воді 60°C, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введенням у ліпосоми. Одержану ліпосомну композицію розбавляли з 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, і 0,22 мкм PVDF фільтр використовували для фільтрування і стерилізації, щоб одержати зразок призначення (концентрація мезилату ерибуліну : 0,2 мг/мл). Аналогічно втіленню 1, визначений ступінь інкапсуляції становив принаймні 90 %.

40 FaDu (одержані від American Type Culture Collection), які є людською лінією фарингеальних сквамозних клітин карциноми, культивували і вирощували в 10% ембріональній бичачій сироватці, що містить MEM культуру. Клітини відділяли від колби, використовуючи 0,05% розчин Трипсин-EDTA і збирали. Після промивання з PBS клітини суспендували у PBS, щоб отримати 5 × 10<sup>7</sup> клітин/мл і зберігали на крижаній бані. 0,1 Мл рідкої клітинної суспензії вводили підшкірно в правий вентральний сегмент 6-тижневим безтимусним мишам (Charles River Laboratories

Japan, Inc). Кожну мишу спостерігали щодня і відповідно робили помітки у випадках патологічних станів. Використовували циркулі, щоб виміряти розмір пухлини протягом довгого часу і розмір пухлини визначали на основі формули обчислення:  $\text{головна вісь} \times (\text{мала вісь у квадрати}) \div 2$ . Коли розмір пухлини становив 100 - 200 мм<sup>3</sup>, мишей розділяли на групи таким чином, що середні значення розмірів пухлини і маса мишей були однорідними серед тестових груп (п'ять мишей на тестову групу), і препарат вводили у хвостову вену (0,2 мл/20г; 3 рази в 7-денні інтервали).

Зміни в середньому об'ємі пухлини після введення зразка показані на Фіг. 2.

Як показано на Фіг. 2, ефект зменшення пухлини не одержували навіть при 4 мг/кг, який є максимально допустимою дозою для вільних речовин, тому що FaDu - лінія клітини з низькою чутливістю до мезилату ерибуліну. Тим часом, у випадку ліпосомної композиції, чіткий ефект зменшення пухлини становив навіть при призначенні 2 мг/кг, яка є нижче максимально допустимої дози, що вказує на те, що надзвичайно високий фармакологічний ефект може бути одержаний навіть для типів раку, проти яких мезилат ерибуліну не мав ефекту.

(Втілення 6)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

Аналогічно втіленню 1, одержували 100 мМ сульфат амонію/30 мМ водна лимонна кислота (pH = 5,5).

<Одержання розчину препарату>

Аналогічно втіленню 5, одержували зразки введення вільної речовини (концентрація мезилату ерибуліну: 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, і 0,4 мг/мл).

<Одержання ліпосомної композиції >

За винятком використання водного розчину внутрішньої фази ліпосоми [водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми], водний розчин одержували як описано вище, ліпосомну композицію (концентрація мезилату ерибуліну: 0,3 мг/мл) одержували аналогічно втіленню 5. Аналогічно втіленню 1, визначений ступінь інкапсуляції становив принаймні 90 %.

ACHN (одержані від American Type Culture Collection), які є нирковою раковою клітинною лінією людини, культивували і вирощували в 10% ембріональній бичачій сироватці, що містить MEM культуру. Клітини відділяли від колби, використовуючи 0,05% розчин Трипсин-EDTA і збирали. Після промивання з PBS клітини суспендували у PBS, щоб одержати  $5 \times 10^7$  клітин/мл і потім зберігали на крижаній бані. 0,1 Мл рідкої клітинної суспензії вводили підшкірно в правий вентральний сегмент 6-тижневим безтимусним мишам (Charles River Laboratories Japan, Inc). Кожну мишу спостерігали щодня і помітки робили у випадку патологічних станів. Використовували циркулі, щоб виміряти розмір пухлини протягом довгого часу, і розмір пухлини визначали на основі формули обчислення:  $\text{головна вісь} \times (\text{мала вісь у квадрати}) \div 2$ . Коли розмір пухлини становив 150 - 200 мм<sup>3</sup>, мишей розділяли на групи таким чином, що середні значення розмірів пухлини і маси мишей були однорідні серед тестових груп (п'ять мишей на тестову групу), і препарат вводили у хвостову вену (0,2 мл/20 г; 3 рази в 7-денних інтервалах).

Результати змін в середньому об'ємі пухлини після введення зразка показані на Фіг. 3.

Як показано на Фіг. 3, оскільки ACHN є лінією клітин, які є резистентними до мезилату ерибуліну, не було знайдено суттєвої відмінності між групою призначення вільних речовин, якій призначали 2 мг/кг, 3 мг/кг і 4 мг/кг (максимальна прийнятна доза) і необробленою групою через 45 днів після початку введення зразка. Тим часом, у групі призначення 3 мг/кг ліпосомної композиції, знайдений ефект супресії росту пухлини і суттєве зменшення об'єму пухлини було у необробленій групі і в групі призначення вільних речовин через 45 днів після початку введення зразка. Таким чином, можливо уповільнити ріст пухлини, одержуючи ліпосомну композицію для пухлини, для якої терапевтичний ефект ніколи не був отриманий із мезилатом ерибуліну.

(Втілення 7)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

Одержували 12 типів водних розчинів для внутрішньої фази, показані нижче в Таблиці 4.

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

120 мг ліпідної суміші (гідрований фосфатидилхолін сої:холестерин: поліетиленгліколь 2000-фосфатидилетаноламін=58,6:19,2:22,2 (по масі)) зважували у пробірки і 3 мл кожного зразка водного розчину для внутрішньої фази нагрівали до 80 °C.

Цей підготовчий розчин ліпосоми гранулювали, використовуючи екструдер, нагрівали приблизно до 80 °C, і одержували ліпосомний підготовчий розчин.

<Одержання розчину ліпосомної дисперсії>

Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину.

Після заміщення зовнішньої фази ліпосоми центрифугували протягом 1 години при  $400 \times g$  і фільтрат повністю видаляли. Осад ресуспендували з 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5), щоб одержати приблизно 2 мл.

Розмір частинок одержаної рідкої ліпосомної дисперсії визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і розмір усіх частинок був приблизно 80 нм.

<Одержання розчину препарату>

Розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину і одержували 5 мг/мл розчину мезилату ерибуліну.

<Одержання ліпосомної композиції>

Рідку ліпосомну дисперсію і розчин мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині таким чином, що концентрація мезилату ерибуліну становила 0,2 мг/мл, і загальна концентрація ліпиду становила 16 мкмоль/мл. Нагрівали протягом 5 хвилин при 60 °C, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми.

<Визначення ступеня інкапсуляції>

Ступінь інкапсуляції визначали аналогічно втіленню 1 і результати наведені в Таблиці 4. Як видно з Таблиці 4, незалежно від того, яку сіль амонію використовували у внутрішній фазі, ступінь інкапсуляції мезилату ерибуліну був безперечно поліпшений. Зокрема, поліпшення ступеня інкапсуляції було відзначено, коли використовували сульфат амонію, цитрат амонію, фосфат амонію і тартрат амонію.

Таблиця 4

№	Композиція	pH	Осмотичний тиск	Ступінь інкапсуляції (%)
1	50 мМ сульфату амонію	7,5 (доведений соляною кислотою або гідроксидом натрію)	300 мОсм (доведений сахарозою)	69,4
2	50 мМ сульфату натрію			7,2
3	50 мМ ацетату амонію			36,8
4	50 мМ ацетату натрію			10,2
5	50 мМ фосфату амонію			45,8
6	50 мМ фосфату натрію			14,6
7	50 мМ цитрату амонію			65,8
8	50 мМ цитрату натрію			8,7
9	50 мМ сукцинату амонію			14,7
10	50 мМ сукцинату натрію			10,0
11	50 мМ тартрату амонію			74,7
12	50 мМ тартрату натрію			11,6

(Втілення 8)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

Аналогічно втіленню 7, водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми одержували від 100 мМ сульфат амонію/30 мМ водна лимонна кислота (pH = 7,5).

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

Аналогічно втіленню 7, використовували вищезгаданий водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми.

<Одержання рідкої ліпосомної дисперсії>

Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину.

Після заміщення зовнішньої фази ліпосоми, центрифугували протягом 1 години при  $400 \times g$ , повністю видаляючи фільтрат. Осад ресуспендували з 96 мг/мл/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5), зовнішню фазу ліпосоми заміщували з 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5), і одержували рідку ліпосомну дисперсію. Розмір частинок одержаної рідкої ліпосомної дисперсії визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і він становив приблизно 80 нм.

Рідку ліпосомну дисперсію розподіляли в сім пробірок і сульфат амонію (пристосований до pH 7,5, використовуючи водний гідроксид натрію) відомої кількості додавали до зовнішньої фази ліпосоми таким чином, що концентрація в пробірках була такою, як наведено в Таблиці 5, і одержували рідку ліпосомну дисперсію, у якій сульфат амонію в зовнішній фазі ліпосоми мав відому концентрацію.

<Одержання розчину препарату>

Розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину і одержували 5 мг/мл розчину мезилату ерибуліну.

<Одержання ліпосомної композиції >

Рідку ліпосомну дисперсію і розчин мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині таким чином, що концентрація мезилату ерибуліну складала 0,2 мг/мл, і загальна концентрація ліпиду становила 16 мМ. Нагрівали протягом 5 хвилин при 60 °С, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми.

<Визначення ступеня інкапсуляції>

Ступінь інкапсуляції визначали аналогічно втіленню 1 і результати наведені в Таблиці 5. Показано, що, якщо навіть сульфат амонію 0,4 мМ присутній у зовнішній фазі ліпосоми, зниження ступеня інкапсуляції є помітним, і інкапсуляція не відбувається, якщо сульфат амонію 10 мМ присутній.

Таблиця 5

№	Внутрішня водна фаза	Концентрація сульфату амонію (мМ) у зовнішній фазі	Ступінь інкапсуляції (%)
1	100 мМ сульфат амонію 30 мМ лимонна кислота pH = 7,5	0	90,4
2		0,016	90,8
3		0,08	91,3
4		0,4	75,9
5		2	36,8
6		10	16,1
7		50	8,6

15 (Втілення 9)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

Аналогічно прикладу 7, водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми одержували з 100 мМ сульфат амонію/30 мМ водна лимонна кислота (pH = 7,5).

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

20 Аналогічно наприкладу 7, використовували вищезгаданий водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми.

<Одержання розчину ліпосомної дисперсії>

Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидин, заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину.

25 Після заміщення зовнішньої фази ліпосоми центрифугували протягом 1 години при 400 × g і фільтрат повністю видаляли. Осад ресуспендували в 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5), зовнішню фазу ліпосоми заміщували 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5) і одержували рідку ліпосомну дисперсію. Розмір частинок одержаної рідкої ліпосомної дисперсії визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і він становив приблизно 80 нм.

<Одержання розчину препарату>

Розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину, і одержували 5 мг/мл розчину мезилату ерибуліну.

35 <Одержання ліпосомної композиції >

Рідку ліпосомну дисперсію і розчин мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині таким чином, що концентрація мезилату ерибуліну становила 0,2 мг/мл, і загальна концентрація ліпиду становила 16 мМ. Як показано в Таблиці 6, pH зовнішньої фази ліпосоми пристосовували, використовуючи 1М водний розчин гідроксиду натрію. Його нагрівали протягом 5 хвилин при 60 °С, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми. Потім, використовували соляну кислоту, щоб коригувати pH зовнішньої фази до 7,5.

<Визначення ступеня інкапсуляції>

40 Ступінь інкапсуляції визначали аналогічно втіленню 1, і результати наведені в Таблиці 6. Поряд з підвищенням pH зовнішньої фази ліпосоми, ступінь інкапсуляції ерибуліну суттєво збільшився, досягаючи майже 100 %.

Таблиця 6

№	Внутрішня водна фаза	pH зовнішньої фази	Ступінь інкапсуляції (%)
1	100 мМ сульфат амонію 30 мМ лимонна кислота pH = 7,5	7,5	72,9
2		8,0	79,8
3		8,5	86,4
4		9,0	92,8
5		9,5	98,5
6		10,0	100,0
7		10,5	99,3

(Втілення 10)

<Одержання водного розчину для внутрішньої фази ліпосоми>

5 Аналогічно прикладу 7, водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми одержували з 100 мМ сульфат амонію/30 мМ водна лимонна кислота (pH = 7,5).

<Одержання підготовчого розчину ліпосоми>

Аналогічно прикладу 7, використовували вищезгаданий водний розчин для внутрішньої фази ліпосоми, щоб одержати підготовчий розчин ліпосоми.

10 <Одержання розчину ліпосомної дисперсії>

Використовуючи колонки Sephadex G-50, одержаний підготовчий розчин ліпосоми елюювали 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину, заміщаючи зовнішню фазу ліпосоми 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину.

15 Рідку ліпосомну дисперсію розподіляли в чотири пробірки, які центрифугували протягом 1 години при 400 × g, і фільтрат повністю видаляли. Осад з двох пробірок ресуспендували з 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5), і зовнішню фазу ліпосоми заміщували з 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5). Осад залишкових двох пробірок ресуспендували із 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5), і зовнішню фазу ліпосоми заміщували 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5).

20 Розмір частинок одержаних рідкої дисперсії ліпосоми визначали, використовуючи спосіб динамічного розсіювання світла, і розмір усіх частинок був приблизно 80 нм.

<Одержання розчину препарату>

25 Розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 96 мг/мл сахароза/10 мМ водний розчин гістидину, і одержували 5 мг/мл розчин мезилату ерибуліну. Точно так само розчин мезилату ерибуліну розчиняли у 0,9% хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину і одержували 5 мг/мл розчин мезилату ерибуліну.

<Одержання ліпосомної композиції >

30 Рідку ліпосомну дисперсію і розчин мезилату ерибуліну змішували в 10 мл скляній посудині таким чином, що концентрація мезилату ерибуліну становила 0,2 мг/мл, і загальна концентрація ліпиду становила 16 мМ. pH зовнішньої фази ліпосоми однієї з двох пробірок 96 мг/мл сахароза/10мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5) пристосовували до 9,5, додаючи гідроксид натрію. Точно так само pH зовнішньої фази ліпосоми однієї з двох пробірок з 0,9 % хлорид натрію/10 мМ водний розчин гістидину (pH = 7,5) доводили до 9,5, додаючи гідроксид натрію. Нагрівали протягом 5 хвилин при 60 °C, щоб одержати ліпосомну композицію з мезилатом ерибуліну, введеним у ліпосоми.

<Визначення ступеня інкапсуляції>

40 Ступінь інкапсуляції визначали аналогічно Втіленню 1 і результати наведені в Таблиці 7. У порівнянні з випадком, коли зовнішньою фазою ліпосоми є сахароза, яка є неелектролітом, у випадку натрію хлориду, який є електролітом, одержаний безперечно високий ступінь інкапсуляції. На додаток до ефекту електроліту, застосовуючи градієнт pH, щоб одержати лужну зовнішню фазу ліпосоми, досягали 100% ступінь інкапсуляції.

Таблиця 7

№	Внутрішня водна фаза	Композиція зовнішньої фази	Ступінь інкапсуляції (%)
1	100 мМ сульфат амонію 30 мМ лимонна кислота pH = 7,5	Сахароза 96 мг/мл 10 мМ гістидин pH = 7,5	72,9
2		0,9 % Хлорид натрію 10 мМ гістидин pH = 7,5	95,9
3		Сахароза 96 мг/мл 10 мМ гістидин pH = 9,5	98,5
4		0,9 % Хлорид натрію 10 мМ гістидин pH = 9,5	100,0

Дана заявка базується на заявці на патент Японії (заявка на патент Японії 2009-082521), поданій 30 березня 2009 і заявці на тимчасовий патент США (61/164653), і зміст цих включено тут як посилання.

Промислова придатність

Даний винахід здатний забезпечити спосіб виробництва ліпосоми з високою стабільністю утримування активної сполуки з високим ступенем інкапсуляції.

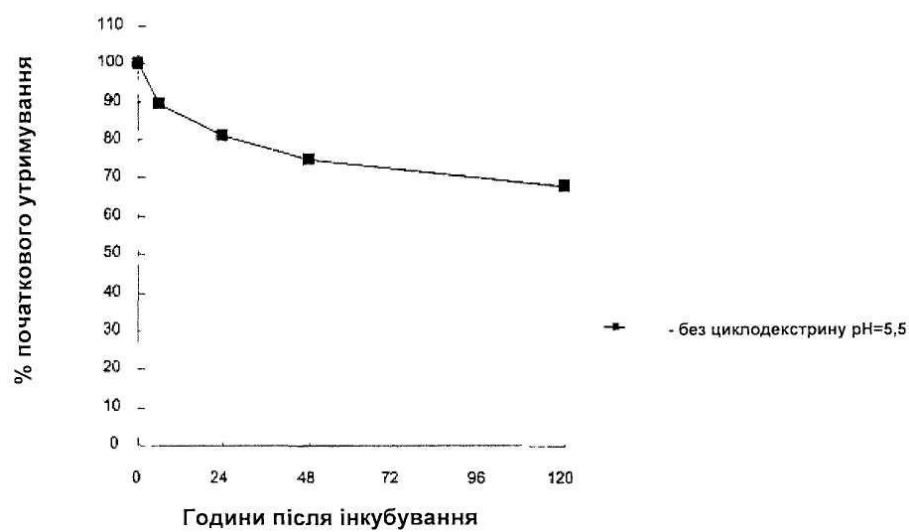
Ліпосомна композиція даного винаходу сприятливо використовується в терапевтичних застосуваннях завдяки фармакологічному ефекту ерибуліну або його фармакологічно допустимої солі.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

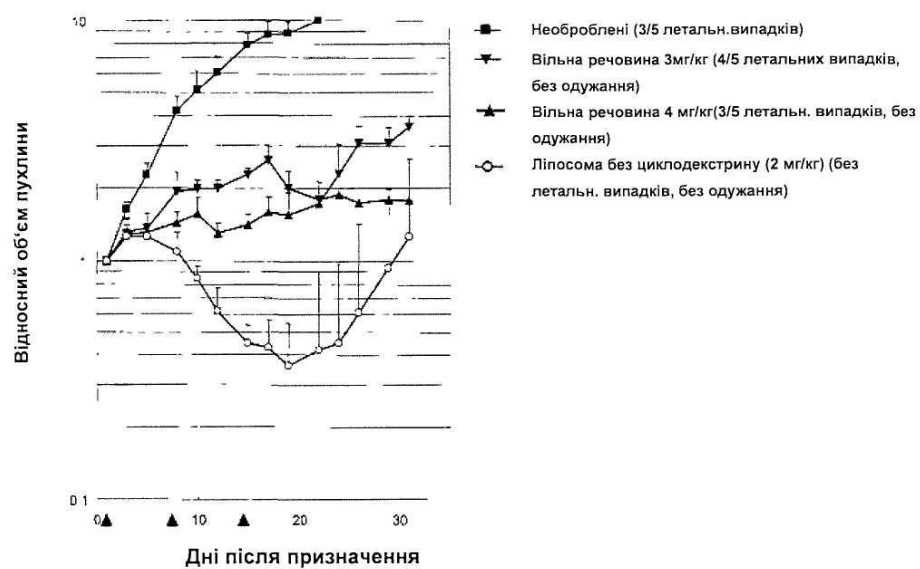
1. Ліпосомна композиція, яка містить ліпосому і яка містить (i) активну сполуку, (ii) сіль амонію і (iii) сіль, кислоту, основу і/або амінокислоту у внутрішній фазі ліпосоми, де активною сполукою є ерибулін або його фармакологічно прийнятна сіль.
2. Ліпосомна композиція за пунктом 1, де ліпосомна композиція перебуває у твердій або рідкій формі.
3. Ліпосомна композиція за пунктом 1 або 2, де концентрація згадуваної солі амонію становить 10 мМ або більше.
4. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-3, де концентрація згадуваної солі становить 1-300 мМ.
5. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-4, де концентрація згадуваної кислоти становить 1-300 мМ.
6. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-5, де концентрація згадуваної амінокислоти становить 1-300 мМ.
7. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-6, де концентрація згадуваної основи становить 1-300 мМ.
8. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-7, де концентрація згадуваної активної сполуки становить 0,01-300 мг/мл.
9. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-8, де згадуваною активною сполукою є ерибуліну мезилат.
10. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-9, де внутрішня фаза ліпосоми додатково містить сульфат амонію, лимонну кислоту і активну сполуку.
11. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-10, де зовнішня фаза ліпосоми містить цукор, електроліт та/або амінокислоту.
12. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-11, де зовнішня фаза ліпосоми містить цукор, електроліт і амінокислоту.
13. Ліпосомна композиція за пунктом 11 або 12, де концентрація згадуваного цукру становить 2-20 %.
14. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 11-13, де концентрація згадуваної амінокислоти становить 1-300 мМ.
15. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-14, де зовнішня фаза ліпосоми містить сахарозу або хлорид натрію і гістидин.

16. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-15, де згадувана внутрішня фаза ліпосоми, по суті, не містить циклодекстрин.
17. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-16, де ліпосома містить гідрований фосфатидилхолін.
- 5 18. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-17, де ліпосома містить холестерин.
19. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-18, де ліпосома містить конденсат метоксиполіетиленгліколю.
20. Ліпосомна композиція за пунктом 19, де згадуваний конденсат метоксиполіетиленгліколю є конденсатом дистеароїлфосфатидилетаноламінполіетилен-гліколю.
- 10 21. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-20, де ліпосома містить гідрований фосфатидилхолін, холестерин і конденсат дистеароїлфосфатидилетаноламінполіетиленгліколю.
22. Ліпосомна композиція за пунктом 21, яка містить 10-80 % згадуваного гідрованого фосфатидилхоліну, 1-60 % згадуваного холестерину і від 0 до 50 % згадуваного конденсату дистеароїлфосфатидилетаноламінполіетиленгліколю.
- 15 23. Ліпосомна композиція за будь-яким з пунктів 1-22, де ліпосома містить гідрований фосфатидилхолін сої, холестерин і поліетиленгліколь-2000 - фосфатидилетаноламін.
24. Спосіб одержання ліпосомної композиції за будь-яким з пунктів 1-23, який включає:  
стадію, на якій одержують рідку ліпосомну дисперсію, що містить ліпосому;  
20 стадію, на якій згадувану рідку ліпосомну дисперсію змішують із згадуваною активною сполукою; і  
стадію, на якій згадувану активну сполуку вводять у внутрішню фазу ліпосоми згадуваної рідкої ліпосомної дисперсії,  
де стадія, на якій одержують згадану рідку ліпосомну дисперсію, включає: стадію, на якій одержують підготовчий розчин ліпосоми, що містить ліпосому і що містить сіль амонію у  
25 внутрішній фазі ліпосоми і зовнішній фазі ліпосоми; і  
стадію, на якій зовнішню фазу ліпосоми згадуваного підготовчого розчину ліпосоми заміщають або розбавляють,  
де стадія, на якій згадувана зовнішня фаза ліпосоми заміщується або розбавляється, є стадією,  
30 на якій рН зовнішньої фази ліпосоми є вищим, ніж рН внутрішньої фази ліпосоми.
25. Спосіб за пунктом 24, де згадувана рідка ліпосомна дисперсія, по суті, не містить солі амонію в зовнішній фазі ліпосоми.
26. Спосіб за пунктом 24 або 25, де рН зовнішньої фази ліпосоми згадуваної рідкої ліпосомної дисперсії становить 3-10.
- 35 27. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-26, де рН зовнішньої фази ліпосоми згадуваної рідкої ліпосомної дисперсії становить 7-10.
28. Спосіб за пунктом 26 або 27, де згадуваним рН є рН зовнішньої фази ліпосоми згадуваної рідкої ліпосомної дисперсії на стадії, на якій змішують згадувану рідку ліпосомну дисперсію і згадувану активну сполуку.
- 40 29. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-28, де стадія, на якій зовнішня фаза ліпосоми є заміщеною або розбавленою, є стадією, на якій рН внутрішньої фази ліпосоми і рН зовнішньої фази ліпосоми становить 1-5.
30. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-29, де рН згадуваної внутрішньої фази ліпосоми становить 3-9.
- 45 31. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-30, де рН згадуваної внутрішньої фази ліпосоми становить 4-9.
32. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-31, де рН згадуваної внутрішньої фази ліпосоми становить 5-8.
33. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-32, де зовнішня фаза ліпосоми є розчином, який містить  
50 електроліт на стадії, на якій вводять згадувану активну сполуку.
34. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-33, де згадувана рідка ліпосомна дисперсія, по суті, не містить циклодекстрин.
35. Спосіб за будь-яким з пунктів 24-34, який додатково містить стадію, на якій рН зовнішньої фази ліпосоми є нейтральним.

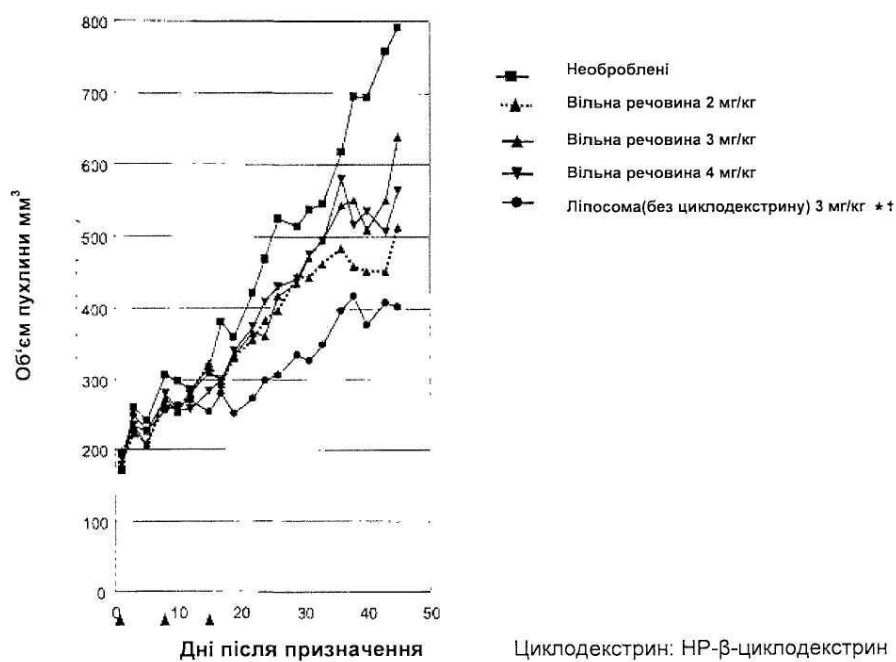
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3



\*: P<0,05 у порівнянні з необробленими

†: P<0,05 у порівнянні з вільною речовиною 3мг/кг

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601