



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85099 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 9/127

A61K 47/30

A61P 35/00

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

(54) ЛІПОСОМАЛЬНИЙ СКЛАД З ІРИНОТЕКАНОМ

1

(21) а200614105
(22) 31.05.2005
(24) 25.12.2008
(86) PCT/JP2005/009953, 31.05.2005
(31) 2004-163742
(32) 01.06.2004
(33) JP
(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.
(72) ЙОСІНО КЕЙСУКЕ, НОЗАВА СІГЕНОРІ, ІСО-
ЗАКІ МАСАСІ, САВАДА СЕЙГО, КАТО ІКУО, МА-
ЦУЗАКІ ТАКЕСІ
(73) КАБУСІКІ КАЙСЯ ЯКУЛТ ХОНСА
(56) JP 2002-527466 A, 27.07.2002
WO 2003/041681 A2, 22.05.2003
JP 2001-064158 A, 13.03.2001
WO 2004/087104 A1, 14.10.2004
(57) 1. Склад з іринотеканом, який містить ліпосо-
му, сформовану мембраною ліпідного біошару, що
містить фосфоліпід як основний компонент мем-
брани, де тільки зовнішня поверхня ліпосоми мо-
дифікована модифікуючим поверхню агентом, що
містить гідрофільний полімер, в якій іринотекан

2

і/або його сіль інкапсульовані у концентрації що-
найменше 0,1мол./мол. (моль лікарського засо-
бу/моль загального ліпиду мембрани) за допомо-
гою іонного градієнта між внутрішньою водною
фазою та зовнішньою водною фазою ліпосоми.
2. Склад з іринотеканом за п.1, де іонний градієнт
являє собою градієнт концентрації протонів із гра-
дієнтом рН, де значення рН внутрішньої водної
фази нижче, ніж значення рН зовнішньої водної
фази.
3. Склад з іринотеканом за п.2, де градієнт рН
утворений градієнтом концентрації іона амонію
і/або градієнтом концентрації органічної сполуки,
яка має аміногрупу, схильну до протонування.
4. Склад з іринотеканом за будь-яким з пп.1-3, де
ліпосома додатково містить ліпід, відмінний від
фосфоліпиду, і/або модифікуючий поверхню агент.
5. Склад з іринотеканом за п.4, який додатково
містить сполуку, яка має основну функціональну
групу, як модифікуючий поверхню агент.
6. Фармацевтична композиція, яка містить склад з
іринотеканом за будь-яким з пп.1-5.

Даний винахід стосується складу з іринотека-
ном, який містить носій у вигляді замкнутої везику-
ли, який містить іринотекан і/або його сіль у висо-
кій концентрації, і фармацевтичної композиції, яка
містить те ж саме.

Однією з категорій фармацевтичних продуктів,
які використовуються для лікування злоякісних
пухлин, є інгібітор топоізомерази, приклади якого
включають камптотексин. Камптотексин являє со-
бою п'ятичленний циклічний алкалоїд, екстрагова-
ний і виділений з [Camptotheca acuminata (рослина
з Китаю) Wall et al. (USA) у 1996р.], і було виявле-
но, що він має високу антинеопластичну активність
і широкий антинеопластичний спектр (непатентний
документ 1). Загальноприйнятий хіміотерапевтич-
ний засіб проявляє антинеопластичну активність
за допомогою інгібування топоізомерази II, у той

час як камптотексин інгібує ферментативну функ-
цію топоізомерази, яка відіграє роль у реплікації
ДНК, репарації, генетичній рекомбінації і транскри-
пції, за допомогою інгібування топоізомерази I.

Існують деякі проблеми при застосуванні кам-
птотексину як лікарського засобу. Серед них, що
стосується нерозчинності у воді, запропоновані
деякі водорозчинні аналоги камптотексину, кожний
з яких є поліпшеним відносно нерозчинності (ди-
висия, наприклад, патентний документ 1). Зокрема,
гідрохлорид іринотекану (CPT-11), який являє со-
бою водорозчинне похідне камптотексину і надій-
шов на ринок в Японії у 1994р., являє собою про-
ліки і проявляє високу антинеопластичну
активність, так що його з нетерпінням очікували у
клінічній галузі. Після введення гідрохлорид ірино-
текану, який є проліками, зазнає метаболізму до

(13) C2

(11) 85099

(19) UA

SN-38, який є активним метаболітом і проявляє антинеопластичну активність.

Тимчасом при введенні іринотекану та його солі трапляються важкі побічні ефекти, такі як дисфункція кісткового мозку і шлунково-кишкове захворювання. Тому його застосування сильно обмежене. Крім того, існує проблема, яка полягає у тому, що антинеопластична активність зменшена гідролізом α -гідроксилактонового кільця через чутливість до водного оточуючого середовища, унікального для камптотецину та його аналога.

Щоб вирішити вищевказані проблеми і проводити оптимальне лікування злоякісних пухлин із застосуванням аналога камптотецину як циклоспецифічного антиметаболіту, необхідно підтримувати місцеву концентрацію лікарського засобу протягом тривалого періоду часу. Однак, існує факт, що такий лікарський засіб має час півжиття, такий нетривалий, як декілька годин після внутрішньовенного введення або підшкірного введення. Застосовним як засіб для контролю вивільнення є засіб, який можна застосовувати для доставки фармацевтичного засобу у терапевтичній концентрації. Одним з підходів для вирішення даних проблем, доставки аналога камптотецину стабільно та ефективно у ділянку осередку-мішені і проявлення антинеопластичної активності у ділянці осередку-мішені є поміщення лікарського засобу у носій, який має форму замкнутої везикули. Вже зроблені деякі пропозиції щодо формування складу ліпосому, яка містить камптотецини. Наприклад, опубліковано, що, коли камптотецин включають у ліпосомну мембрану, гідроліз α -гідроксилактонового кільця приглушений (дивися, наприклад, патентний документ 2 і непатентний документ 2). Крім того, описаний спосіб, який допускає вміст у ліпосомній мембрані власне SN-38, який є основною активною частиною гідрохлориду іринотекану (непатентні документи 3 і 4). Однак SN-38 важко стабілізується у ліпосомній мембрані і швидко зникає у крові, так що важко підтримувати концентрацію SN-38 у плазмі протягом тривалого часу.

Опублікований також приклад виробництва на основі загальноприйнятого способу, в якому гідрохлорид іринотекану (водорозчинне похідне) поміщають у ліпосому способом пасивного завантаження і стабілізують електростатичною фіксацією на мембрані ліпідного бішару (непатентний документ 5).

Патентний документ 1: [JP 3-4077 B]

Патентний документ 2: [JP 9-504517 A]

Непатентний документ 1: [Am. Chem. Soc, 94 (1966), 388]

Непатентний документ 2: [Tomas G. Burke et al., Biochemistry, 32 (1993), 5352-5364]

Непатентний документ 3: [W. Gao et al., J. of Chromatography B, 791 (2003), 85-92]

Непатентний документ 4: [Joshua Williams et al., J. of Controlled Release, 91 (2003), 167-172]

Непатентний документ 5: [Yasuyuki Sazuka et al., Cancer Letter 127 (1998), 99-106]

Проблеми, які підлягають вирішенню за допомогою винаходу

Кількість гідрохлориду іринотекану для включення у ліпосому, описаним вище вже опублікованим способом інкапсуляції гідрохлориду іринотекану способом пасивного завантаження, становить приблизно 0,05 (лікарський засіб (моль)/загальний ліпід (моль)). З такою введеною кількістю важко підтримувати протягом тривалого часу концентрацію гідрохлориду іринотекану у плазмі і концентрацію SN-38, який є його активним метаболітом, і даних кількостей недостатньо для клінічних ефектів. Хоча формуванням ліпосом поліпшують здатність до утримування гідрохлориду іринотекану у крові, концентрацію у плазмі SN-38, який є активним метаболітом, важко підтримувати довгий час, оскільки швидкість зникнення із крові є все ще високою.

Ще не опубліковано складу, який містить клінічно придатну/достатню інкапсульовану кількість іринотекану (проліків) і/або його солі у замкнутій везикулі, який існує у крові у стані приглушеного гідролізу α -гідроксилактонового кільця протягом тривалого часу для підтримання концентрації SN-38 у плазмі, який є активним метаболітом гідрохлориду іринотекану, протягом тривалого часу.

Беручи до уваги дані обставини, метою даного винаходу є надання як складу, який містить достатню для клінічних ефектів кількість інкапсульованого лікарського засобу, складу з іринотеканом, здатного включати іринотекан і/або його сіль у замкнутій везикулі з високою ефективністю інкапсуляції щонайменше 0,07 (лікарський засіб (моль)/загальний ліпід (моль)) і підтримувати концентрацію SN-38 у плазмі, який є активним метаболітом гідрохлориду іринотекану, протягом тривалого часу.

Способи вирішення проблем

Автори даного винаходу провели численні дослідження для досягнення описаних вище цілей. У результаті вони одержали наступні висновки: коли спосіб дистанційного завантаження, який базується на іонному градієнті, зокрема, вибирають як спосіб інкапсуляції лікарського засобу для іринотекану і/або його солі у замкнутій везикулі (формують іонний градієнт всередині/зовні замкнутої частинки, і дозволяють лікарському засобу проникати через мембрану замкнутої везикули для введення лікарського засобу), лікарський засіб можна інкапсулювати у високій концентрації, якої важко досягнути традиційним способом пасивного завантаження, і здатність до утримування у крові значно поліпшується порівняно з ліпосомою, одержаною загальноприйнятим способом, у результаті чого концентрацію 7-етил-10-гідрокси-камптотецину (SN-38) (який є активним метаболітом гідрохлориду іринотекану) у плазмі можна підтримувати постійною протягом тривалого періоду часу. Крім того, автори даного винаходу одержали наступні дані: при виборі способу дистанційного завантаження можна значно поліпшити стабільність складу при 37°C і довгочасну стабільність складу при 4°C. Таким чином, підтвердили, що можна одержати склад, який містить замкнуту везикулу, в яку інкапсульований іринотекан з високою ефективністю інкапсуляції 0,07 (лікарський засіб (моль)/загальні ліпіди (моль)), що є достатньою

кількістю інкапсульованого лікарського засобу для клінічного ефекту. Не було опубліковано складу, який містить замкнуту везикулу, в яку інкапсульований іринотекан і/або його сіль у такій концентрації, і здатний підтримувати концентрацію SN-38 (який є активним метаболітом гідрохлориду іринотекану) у плазмі протягом тривалого часу. Відповідно, для досягнення описаних вище цілей даний винахід забезпечує наступне.

(1) Склад з іринотеканом, який містить замкнуту везикулу, сформовану ліпідною мембраною, в яку інкапсульований іринотекан і/або його сіль у концентрації щонайменше 0,07моль/моль. (моль лікарського засобу/моль загального мембранного ліпиду).

У переважному аспекті склад з іринотеканом містить лікарський засіб у концентрації вищій, ніж щонайменше 0,1моль лікарського засобу/моль ліпиду.

Середній розмір частинок складу з іринотеканом за даним винаходом становить Переважно від 0,02 до 250нм.

За даним винаходом іринотекан і/або його сіль можна інкапсулювати у замкнуту везикулу у високій концентрації за допомогою, наприклад, поданого нижче способу дистанційного завантаження із застосуванням іонного градієнта, який.

(2) Склад з іринотеканом за пунктом (1), в якому склад з іринотеканом має іонний градієнт між внутрішньою водною фазою і зовнішньою водною фазою замкнутої везикули. Із застосуванням вищеописаного іонного градієнта іринотекан і/або його сіль можна включати у замкнуту везикулу в іонізованому стані при концентрації.

(3) Склад з іринотеканом за пунктом (2), в якому іонний градієнт являє собою градієнт концентрації протонів із градієнтом рН, де значення рН внутрішньої водної фази нижче, ніж значення рН зовнішньої водної фази.

(4) Склад з іринотеканом за пунктом (3), в якому градієнт рН утворений градієнтом концентрації іона амонію і/або градієнтом концентрації органічної сполуки, яка має аміногрупу, схильну до протонування. Наприклад, у випадку, де концентрація іона амонію у внутрішній водній фазі вища, ніж у зовнішній водній фазі, можна сформувати градієнт рН, де значення рН внутрішньої водної фази нижче, ніж значення рН зовнішньої водної фази.

(5) Склад з іринотеканом за будь-яким з пунктів (1)-(4), в якому замкнута везикула являє собою ліпосому, сформовану мембраною ліпідного бішару, який містить фосфоліпід як основний компонент мембрани.

У пункті (5) вище переважним є аспект, в якому основний компонент мембрани являє собою фосфоліпід з температурою фазового переходу 50°C або більшою.

Конкретні переважні приклади фосфоліпиду включають гідрогенізований фосфоліпід і/або сфінгофосфоліпід.

(6) Ліпосома може додатково містити ліпід, відмінний від фосфоліпиду, і/або модифікуючий поверхню агент.

Як інший ліпід переважним є холестерин.

Переважні приклади модифікуючого поверхню агента включають похідне гідрофільного полімеру. Конкретні приклади гідрофільного полімеру включають поліетиленгліколь з молекулярною масою від 500 до 10000 дальтон, який можна вводити у вигляді похідного фосфоліпиду або холестерину.

(7) Склад з іринотеканом за пунктом (6), в якому тільки зовнішня поверхня ліпосоми переважно модифікована гідрофільним полімером в аспекті, в якому похідне гідрофільного полімеру міститься як модифікуючий поверхню агент.

(8) Також переважним є аспект, в якому склад з іринотеканом за пунктом (6) або (7) містить сполуку, яка має основну функціональну групу, як модифікуючий поверхню агент.

Особливо переважні приклади сполуки, яка має основну функціональну групу, включають гідрохлорид 3,5-дипентадецилоксибензамідину.

(9) Фармацевтична композиція, яка містить склад з іринотеканом за будь-яким з пунктів (1)-(8).

(10) Профілактичний і/або терапевтичний спосіб відносно захворювання, який передбачає введення хазяїнові профілактично і/або терапевтично ефективної кількості складу з іринотеканом за будь-яким з пунктів (1)-(8).

(11) Спосіб вивільнення ефективної кількості іринотекану і/або його солі у хазяїні, який передбачає введення хазяїнові складу з іринотеканом за будь-яким з пунктів (1)-(8).

(12) Спосіб впливу ефективною кількістю іринотекану і/або його солі на ділянку-мішень, який передбачає введення хазяїнові складу з іринотеканом за будь-яким з пунктів (1)-(8).

Склад з іринотеканом, наданий за даним винаходом, інкапсулює іринотекан і/або його сіль в інкапсульованій кількості щонайменше 0,07 (лікарський засіб (моль)/загальні ліпіди (моль)) і містить лікарський засіб у високій концентрації, достатній для клінічного ефекту. Як описано у прикладах нижче, склад з іринотеканом за даним винаходом має значно поліпшену здатність до утримування у крові порівняно із загальновідомим складом ліпосоми з іринотеканом, так що він може бути присутнім у крові протягом тривалого періоду часу. Крім того, склад має значно поліпшену стабільність складу при 37°C і довгочасну стабільність складу при 4°C.

Короткий опис малюнків

[Фіг.1] Графік, який показує результати (швидкість вивільнення) тесту збільшеної стабільності складу при 37°C для складу з CPT-11, одержаного у прикладі 1.

[Фіг.2] Графік, який показує результати (швидкість вивільнення) тесту збільшеної стабільності складу при 37°C для складу з CPT-11, одержаного у прикладі 3.

[Фіг.3] Графік, який показує результати (розмір частинок) тесту збільшеної стабільності складу при 37°C для складу з CPT-11, одержаного у прикладі 3.

[Фіг.4] Графік, який показує концентрації гідрохлориду іринотекану у плазмі для кожного часу відбору крові після ін'єкції у тесті здатності до утримування у крові.

[Фіг.5] Графік, який показує взаємозв'язок між значенням pH у зовнішній водній фазі та ефективністю інкапсуляції CPT-11 (%) або співвідношення присутності відкритої кільцевої форми (%).

[Фіг.6] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11, одержаного у прикладі 8 за даним винаходом, по зміні з часом передбачуваного об'єму пухлини.

[Фіг.7] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11, одержаного у прикладі 8 за даним винаходом, по зміні маси тіла миші.

[Фіг.8] Діаграма, яка показує зміну загальної концентрації CPT-11 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті у прикладі 8.

[Фіг.9] Діаграма, яка показує зміну концентрації вивільненого з ліпосоми CPT-11 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 8.

[Фіг.10] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 8.

[Фіг.11] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38G у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 8.

[Фіг.12] Діаграма, яка показує гемотоксичність (лімфоцит) препарату CPT-11, одержаного у прикладі 8.

[Фіг.13] Діаграма, яка показує гемотоксичність (нейтрофіл) препарату CPT-11, одержаного у прикладі 8.

[Фіг.14] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11, одержаного у прикладі 9, по зміні з часом передбачуваного об'єму пухлини.

[Фіг.15] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11, одержаного у прикладі 9, по зміні маси тіла миші.

[Фіг.16] Діаграма, яка показує зміну загальної концентрації CPT-11 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті для препарату CPT-11 у прикладі 9.

[Фіг.17] Діаграма, яка показує зміну концентрації вивільненого з ліпосоми CPT-11 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 9.

[Фіг.18] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 9.

[Фіг.19] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38G у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 9.

[Фіг.20] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11 по зміні з часом передбачуваного об'єму пухлини у прикладі 10.

[Фіг.21] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11 по зміні маси тіла миші у прикладі 10.

[Фіг.22] Діаграма, яка показує зміну концентрації CPT-11 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті для препарату CPT-11 у прикладі 10.

[Фіг.23] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38 у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 10.

[Фіг.24] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38G у плазмі крові у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 10.

[Фіг.25] Діаграма, яка показує зміну концентрації CPT-11 у пухлинах у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 10.

[Фіг.26] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38 у пухлинах у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 10.

[Фіг.27] Діаграма, яка показує зміну концентрації SN-38G у пухлинах у фармакокінетичному експерименті на препараті CPT-11 у прикладі 10.

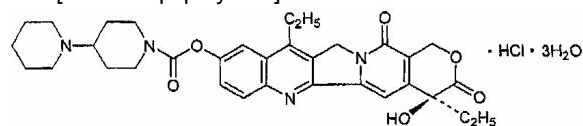
[Фіг.28] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11 по зміні з часом передбачуваного об'єму пухлини у прикладі 12.

[Фіг.29] Діаграма, яка показує протипухлинний ефект препарату CPT-11 по зміні маси тіла миші у прикладі 12.

Далі даний винахід буде описаний більш докладно.

Іринотекан являє собою сполуку, яка має каркас камптотецину, і його зображають хімічним найменуванням (+)-(4S)-4,11-діетил-4-гідрокси-9-[(4-піперидино-піперидино)карбонілокси]-1Н-пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-b]хінолін-3,14(4Н,12Н)діон. Іринотекан і/або його сіль являє собою антинеопластичний засіб і є водорозчинною речовиною, застосовуваною у формі солі-гідрохлориду (іринотекан·HCl (гідрохлорид)), показаний нижче. У даному описі на термін «іринотекан і/або його сіль» іноді посилаються як на «іринотекан» або «лікарський засіб». Тимчасом, на термін «сіль-гідрохлорид іринотекану» іноді посилаються як на «гідрохлорид іринотекану» або «CPT-11».

[Хімічна формула 1]



Даний винахід стосується складу з іринотеканом, який містить замкнуту везикулу (носіє), сформовану ліпідною мембраною, в якій описаний вище іринотекан і/або його сіль інкапсульований з високою ефективністю інкапсуляції 0,07мол./мол. (лікарський засіб (моль)/загальний ліпід (моль)) або більшою.

Замкнута везикула не є обмеженою певним чином і може бути присутньою у різних формах, поки вона має структуру, здатну містити лікарський засіб. Можна застосовувати ліпосому, ліпідну мікросферу, наночастинку або подібні, які мають потенційну функціональну здатність інкапсулювати лікарський засіб тут у високій концентрації. З них найбільш переважним прикладом форми є ліпосома.

Нижче буде зроблений опис, беручи як приклад аспект, в якому носій складу з іринотеканом за даним винаходом являє собою особливо переважну ліпосому.

Ліпосома сформована з мембрани з фосфоліпідного шару і являє собою замкнуту везикулу, яка має структуру, яка формує простір, відокремлений від зовнішньої ділянки мембраною, сформованою на основі полярних властивостей гідрофобних груп і гідрофільних груп ліпиду, і водна фаза (внутрішня водна фаза) поміщена у простір везикули. Ліпосомний склад формують із застосуванням ліпосом, яка містить ліки, як носія.

«Фосфоліпід» являє собою основний компонент біомембрани, є амфіфільною речовиною, і молекула має гідрофобну групу, яка складається із довголанцюжкової алкільної групи, і гідрофільну групу, яка складається з фосфатної групи. Приклади фосфоліпиду включають фосфатидилхоліни (=лецитин), фосфатидилгліцерин, фосфатидну кислоту, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол і сфінгофосфоліпід, такий як сфінгомієлін, природний або синтетичний фосфоліпід, такий як кардіоліпін або їх похідні, і сполуку, гідрогенізовану загальноприйнятим способом. Далі термін «фосфоліпід» іноді стосується фосфоліпідів, щоб охоплювати їх.

З них переважними є гідрогенізований фосфоліпід, такий як гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін (HSPC), сфінгомієлін (SM), і подібні.

Як основний компонент мембрани можуть бути присутніми один вид фосфоліпиду або різні види фосфоліпідів.

У ліпосомі фосфоліпід, який має температуру фазового переходу, яка перевищує температуру тіла (35-37°C), переважно застосовують як основний компонент мембрани, як не так легко пропусकाючий інкапсульований лікарський засіб протягом періоду зберігання або в організмі, наприклад, у крові. Крім того, у випадку одержання такої ліпосоми, її іноді піддають впливу більш високої температури, ніж температура тіла. Тобто, ліпосому іноді одержують в умовах температури приблизно від 50 до 70°C, наприклад, приблизно 60°C, і збільшують вплив нагрівання на формування ліпосоми, так що особливо переважно застосовують основний компонент мембрани, який має температуру фазового переходу, яка перевищує дані температури. Зокрема, основний компонент мембрани переважно являє собою фосфоліпід, який має температуру фазового переходу 50°C або вищу.

Ліпосома може містити інший мембранний компонент разом з вищеописаним основним компонентом мембрани. Наприклад, переважно, щоб ліпосома містила ліпід, відмінний від фосфоліпиду, або його похідне (далі іноді вказують як інші ліпіди), і мембрану формують із ліпиду, змішаного разом з вищеописаним фосфоліпідом.

Термін «ліпід, відмінний від фосфоліпиду» означає ліпід, який містить у молекулі гідрофобну групу, яка складається із довголанцюжкової алкільної групи або подібної, і не містить у молекулі фосфатної групи. Він включає як необмежувальні приклади гліцерогліколіпіди, сфінгогліколіпіди і стерини, такі як холестерин (описаний нижче як стабілізуювальний агент), та їх похідне, таке як гідрогенізований продукт. Приклади похідного холестерину включають стерини, які мають кожний циклопентаноїдрофенантенове кільце, і вони включають як необмежувальні конкретні приклади холестерин.

Змішаний ліпід може містити один вид або різні види інших ліпідів.

Швидкість вивільнення складу з іринотеканом у плазмі можна регулювати за допомогою кількості холестерину. Для зменшення швидкості вивільнення до низького рівня склад містить холестерин

у кількості переважно від 0 до 20%мол., у той час як для збільшення швидкості вивільнення до високого рівня склад містить холестерин у кількості від 30 до 50%мол., переважно від 40 до 50%мол.

Ліпосома за даним винаходом може підтримувати вищеописану мембранну структуру разом з вищеописаним формуючим мембрану ліпідом і може містити інший мембранний компонент, здатний міститися у ліпосомі без відхилення від цілей даного винаходу. Приклади іншого мембранного компонента включають модифікуючий поверхню агент для забезпечення призначеної характеристики компоненту мембрани носія за допомогою зміни фізичної властивості ліпиду. Приклади модифікуючого поверхню агента включають як необмежувальні конкретно приклади заряджену речовину, похідне гідрофільного полімеру, похідне водорозчинного полісахариду і подібні.

Приклади заряджених речовин включають як необмежувальні конкретно приклади речовину, яка має основну функціональну групу, таку як аміногрупа, амідиногрупа або гуанідиногрупа; сполуки, які мають кислу функціональну групу, і подібні.

Приклади основної сполуки включають DOTMA, описаний у [JP 61-161246 A], DOTAP, описаний у [JP 05-508626 A], трансфектам, описаний у [JP 02-292246 A], TMAG, описаний у [JP 04-108391 A], сіль гідрохлориду 3,5-дипентадецилоксибензамідину, описані у [WO 97/42166], і подібні DOSPA, TfxTM-50, DDAB, DC-CHOL, і DMRIE.

Приклади сполуки, яка має кислу функціональну групу, включають: жирну кислоту, таку як олеїнова кислота, стеаринова кислота; гангліозиди з сіаловою кислотою, такі як гангліозид GM1 і гангліозид GM3; поверхнево-активну речовину на основі кислих амінокислот, таку як N-ацил-L-глутамін, і подібні.

У випадку, якщо вищеописана заряджена речовина являє собою речовину, яка включає сполуку, яка має основну функціональну групу, зв'язану з ліпідом, на неї посилюються як на катіонізований ліпід. Ліпідний компонент катіонізованого ліпиду стабілізований у ліпідному бішарі ліпосоми, а компонент основної функціональної групи може бути присутнім на поверхні мембрани ліпідного бішару носія (на внутрішній поверхні мембрани і/або на зовнішній поверхні мембрани). Модифікація мембрани катіонізованим ліпідом дозволяє поліпшити адгезивність або подібне між мембраною ліпосоми і клітиною.

Водорозчинні полісахариди включають як необмежувальні конкретно приклади водорозчинні полісахариди, такі як глюкуронова кислота, сіалова кислота, декстран, пулулан, амілоза, амілопектин, хітозан, манан, циклодекстрин, пектин і каргенан. Приклади похідних водорозчинних полісахаридів включають гліколіпід або подібні.

Гідрофільні полімери включають як необмежувальні конкретно приклади поліетиленгліколь, фікол, полівініловий спирт, переміжний співполімер стиролу -малеїнового ангідриду, переміжний співполімер дивінілового ефіру -малеїнового ангідриду, полівінілпіролідон, полівінілметиловий ефір, полівінілметилоксазолін, поліетилоксазолін, полі-

гідроксипропілоксазолін, полігідроксипропілметакриламід, поліметакриламід, полідиметилакриламід, полігідроксипропілметакрилат, полігідроксіетилакрилат, гідроксиметилцелюлозу, гідроксіетилцелюлозу, поліаспартамід і синтетичну поліамінокислоту.

Гідрофільний полімер переважно має структуру для модифікації ліпосоми. Зокрема, дану структуру має один з кінців ланцюга полімеру. Тобто, переважно, щоб застосовуваний гідрофільний полімер для модифікації містив основний компонент молекули гідрофільного полімеру і структурний компонент для модифікації ліпосоми. У випадку, коли дана структура являє собою гідрофобний компонент, такий як ліпід, основний компонент молекули гідрофільного полімеру фіксований так, щоб виступати із зовнішньої поверхні ліпосоми у такій формі, що гідрофобний компонент вставлений у мембрану ліпосоми, у той час як у випадку, де структура являє собою реакційноздатну функціональну групу, здатну ковалентно зв'язувати мембранний компонент ліпосоми, основний компонент молекули гідрофільного полімеру фіксований так, щоб виступати із зовнішньої поверхні ліпосоми завдяки ковалентному зв'язку з мембранним компонентом ліпосоми, таким як фосфоліпід, експонований на зовнішній поверхні ліпосоми.

Далі наступною буде описана гідрофобна сполука для застосування для одержання компонента гідрофільний полімер - гідрофобний полімер за допомогою зв'язування з основним компонентом молекули гідрофільного полімеру.

Гідрофобна сполука не є конкретно обмеженою. Її приклади включають сполуку, яка має гідрофобну ділянку (гідрофобну сполуку). Приклади гідрофобної сполуки включають: фосфоліпід та інший ліпід, такий як стерин, які формують змішаний ліпід, описаний нижче; довголанцюжковий аліфатичний спирт; складний ефір гліцерину і жирної кислоти; і подібні. З них переважний аспект являє собою фосфоліпід. Крім того, гідрофобна сполука може мати реакційноздатну функціональну групу. Зв'язок, утворений реакційноздатною функціональною групою, бажано, є ковалентним зв'язком, і його конкретні приклади включають як необмежувальні конкретно приклади амідний зв'язок, складноефірний зв'язок, ефірний зв'язок, сульфідний зв'язок або дисульфідний зв'язок.

Ацильний ланцюг, включений у фосфоліпід, переважно являє собою насичену жирну кислоту. Довжина ланцюга ацильного ланцюга переважно становить від C₁₄ до C₂₀, більш переважно від C₁₆ до C₁₈. Приклади ацильного ланцюга включають дипальмітоїл, дистеароїл і пальмітоїлстеароїл.

Фосфоліпід не є обмеженим конкретно. Наприклад, як фосфоліпід можна застосовувати фосфоліпід, який має функціональну групу, здатну реагувати з гідрофільним полімером. Конкретні приклади такого фосфоліпиду, який має функціональну групу, здатну реагувати з гідрофільним полімером, включають фосфатидилетаноламін, який має аміногрупи, фосфатидилгліцерин, який має гідроксигрупи, і фосфатидилсерин, який має карбоксильні групи. Переважним аспектом є за-

стосування описаного вище фосфатидилетаноламіну.

Похідне гідрофільного полімеру-ліпиду складає не з описаних вище гідрофільного полімеру і ліпиду. Сполучення описаних вище гідрофільного полімеру і ліпиду не є обмеженим конкретно. Залежно від мети, можна застосовувати відповідне сполучення. Його приклади включають похідне гідрофільного полімеру, одержане зв'язуванням щонайменше одного, вибраного з фосфоліпиду, інших ліпідів, таких як стерин, довголанцюжкового аліфатичного спирту, і складного ефіру гліцерину і жирної кислоти, зі щонайменше одним, вибраним з PEG, PG і PPG. Конкретні приклади цього включають поліоксипропіленалкіл, зокрема, переважним аспектом є те, що у випадку, де гідрофільний полімер являє собою поліетиленгліколь (PEG), як ліпід вибирають фосфоліпід або холестерин. Приклади похідного PEG-ліпиду, сформованого таким сполученням, включають похідне PEG-фосфоліпиду або похідне PEG-холестерину.

Для похідного гідрофільного полімеру-ліпиду можна вибирати позитивно, негативно або нейтрально заряджене похідне за допомогою вибору ліпиду. Наприклад, у випадку, де як ліпід вибирають DSPE, похідне ліпиду демонструє негативний заряд завдяки ефекту фосфатних груп, тоді як у випадку, де як ліпід вибирають холестерин, похідне ліпиду демонструє нейтральний заряд. Ліпід можна вибирати залежно від мети.

Молекулярна маса PEG не є обмеженою конкретно. Як правило, молекулярна маса PEG становить від 500 до 10000 дальтон, переважно від 1000 до 7000 дальтон, і більш переважно від 2000 до 5000 дальтон.

Молекулярна маса PG не є обмеженою конкретно. Загалом, молекулярна маса PG становить від 100 до 10000 дальтон, переважно від 200 до 7000 дальтон, і більш переважно від 400 до 5000 дальтон.

Молекулярна маса PPG не є обмеженою конкретно. Як правило, молекулярна маса PPG становить від 100 до 10000 дальтон, переважно від 200 до 7000 дальтон, і більш переважно від 1000 до 5000 дальтон.

З цього переважний аспект являє собою похідне PEG-фосфоліпиду. Приклади похідного PEG-фосфоліпиду включають поліетиленгліколь-дистеароїлфосфатидилетаноламін (PEG-DSPE). PEG-DSPE є переважним, тому що він являє собою універсальну сполуку і є легко доступним.

Описаний вище гідрофільний полімер можна застосовувати окремо, або два або більше полімерів можна застосовувати у сполученні.

Таке похідне гідрофільного полімеру-ліпиду можна одержати загальноприйнятим способом. Приклади способу синтезу похідного PEG-фосфоліпиду, яке є прикладом похідного гідрофільного полімеру-ліпиду, включають спосіб взаємодії PEG з фосфоліпідом, який має функціональну групу, здатну реагувати з PEG, із застосуванням каталізатора. Приклади каталізатора включають ціануровий хлорид, карбодімід, ангідрид кислоти і глутаральдегід. Вищеописані функціональні групи дозволяють ковалентно зв'язуватися з PEG

за допомогою такої реакції, одержуючи таким чином похідне PEG-фосфоліпиду.

У ліпосомі, яка зазнає поверхневої модифікації із застосуванням такого похідного гідрофільного полімеру-ліпиду, коли попереджають адсорбцію білка опсоніну або подібного у плазмі на поверхні ліпосоми, стабільність ліпосоми у крові збільшується, можна уникнути захоплення RES, і можна поліпшити здатність доставки лікарського засобу до тканини або клітини, яка є мішенню доставки.

Модифіковане співвідношення мембранний ліпід (загальний ліпід) для вищеописаного похідного гідрофільного полімеру-ліпиду становить, як відношення до мембранного ліпиду, звичайно від 0,1 до 20%мол., переважно від 0,1 до 5%мол., більш переважно від 0,5 до 5%мол..

Потрібно зазначити, що за даним винаходом термін «загальні ліпіди» означає загальні ліпіди, які формують мембрану, відмінні від похідних гідрофільного полімеру-ліпиду. Конкретно, він включає фосфоліпіди та інші ліпіди (включаючи холестерин), далі включає модифікуючий поверхню агент, у випадку, де включений модифікуючий поверхню агент, відмінний від похідного гідрофільного полімеру-ліпиду, але не включає фосфоліпід, такий як фосфатидилетаноламін (PE) або холестерин, які включені у похідне гідрофільного полімеру-ліпиду.

За даним винаходом модифікацію мембрани ліпосоми вищеописаним похідним гідрофільного полімеру-ліпиду (PEG-PE) можна проводити розподілом гідрофільного полімеру (PEG) як зовні, так і зсередини ліпідної мембрани (бішару), або розподілом вибірно у зовнішній мембрані. Конкретно, при одержанні ліпосомного складу, описаного нижче, ліпосому можна формувати після рівномірного змішування формуючого ліпосому ліпиду і PEG-PE (пре-введення). PEG-PE можна вводити після формування ліпосоми загальноприйнятим способом, із застосуванням змішаного ліпиду, одержаного змішуванням формуючих ліпосому ліпідів, які не містять PEG-PE (пост-введення), але особливо переважною є ліпосома, одержана вибірною модифікацією поверхні тільки зовнішнього шару ліпідної мембрани бішару за допомогою модифікації поверхні мембрани гідрофільним полімером зовні після формування немодифікованої ліпосоми, складеної з ліпідного бішару (пост-введення). У даному випадку, коли похідне гідрофільного полімеру-ліпиду застосовують як модифікуючий агент для введення гідрофільного полімеру, компонент гідрофільного полімеру підтримують у стані, в якому він виступає назовні, і ліпідний компонент, який є гідрофобним компонентом, підтримують у стабільному стані за допомогою введення у ліпідну бішарову мембрану ліпосоми, так що можна сформувати ліпосому, яка має поверхню зовнішнього шару ліпідного бішару, в якому присутній і розподілений гідрофільний полімер, зв'язаний з ліпідом.

Після стадії формування ліпосоми відбувається дестабілізація, така як агрегація, яка залежить від температури або від часу. Така дестабілізація розрізняється відповідно до ліпідного складу ліпосоми, так що відомо, що температура або час роз-

різняється відповідно до ліпідного складу. Щоб уникнути дестабілізації, яка розрізняється відповідно до ліпідного складу, бажано поміщати стадію модифікації гідрофільним полімером після стадії формування ліпосоми.

Бажаним є час додавання гідрофільного полімеру на стадії додавання гідрофільного полімеру, бажано майже негайно після стадії формування ліпосоми. Конкретно, час переважно становить у межах 180 хвилин, тому що вплив нагрівання на компоненти мембрани або поміщені речовини є невеликим. Більш переважно час становить у межах 120 хвилин, більш переважно у межах 45 хвилин, найбільш бажано негайно після стадії формування ліпосоми. Більш конкретно, після стадії формування ліпосоми, ліпосомний дисперсант можна заливати безпосередньо у розчин гідрофільного полімеру. Тимчасом, можна прийняти спосіб додавання розчину гідрофільного полімеру до ліпосомного дисперсанта після стадії формування ліпосоми. Крім того, можна також прийняти спосіб декантування ліпосомного дисперсанта і розчину гідрофільного полімеру одночасно в іншу ємність для змішування. У даному випадку з точки зору однорідності концентрації і вирівнювання температури, бажано додавати стадію перемішування за допомогою змішувача або подібного.

Після додавання гідрофільного полімеру на стадії модифікації гідрофільним полімером суміш бажано перемішувати з нагріванням протягом визначеного часу при температурі фазового переходу або вищій. Час перемішування з нагріванням становить від 0 до 120 хвилин, переважно від 0 до 60 хвилин, більш переважно від 0 до 45 хвилин.

На протипагу описаним вище способом, ліпосому, яка містить формуючий мембрану ліпід, такий як фосфоліпід, який має реакційноздатну функціональну групу, одержують загальноприйнятим способом, і потім додають активований на кінці PEG до зовнішньої рідини ліпосоми для зв'язування з формуючим мембрану ліпідом, таким як фосфоліпід, який має функціональну групу, таким чином одержуючи ліпосому.

У відмінному від вищеописаних способів, описані вище компоненти змішують, і суміш вивантажують під високим тиском за допомогою емульсифікатора з типом розвантаження під високим тиском, таким чином одержуючи ліпосому. Даний спосіб конкретно описаний у "Liposome in Life Science" [Terada, Yoshimura, et al.; Springer-Verlag Tokyo (1992)], зміст якої наведений тут як посилання.

В описаному вище випадку, для сортування ліпосом за розмірами до визначеного розміру, доступні декілька способів [edited by G.Gregoriadis "Liposome Technology Liposome Preparation and Related Techniques" 2nd edition, Vol.I-III, CRC Press], зміст якої наведений тут як посилання.

Як структура ліпідної мембрани ліпосоми відомі такі мембранні структури, як одношарова везикула (мала одношарова везикула (SUV) або велика одношарова везикула (LUV)) з ліпідного бішару і багатошарова везикула (MLV), яка містить множини ліпідних бішарів.

Хоча ліпосому за даним винаходом можна складати з будь-якою мембранною структурою, переважною є ліпосома, яка складається з одношарової везикули, і конкретно, переважною є ліпосома LUV.

Дисперсант ліпосоми можна формувати в одношаровій формі багаторазовим пропусканням із силою через фільтр із застосуванням екструдера. Загалом, застосовували два або більше видів фільтрів з різним розміром пор (фільтр із розміром пор більшим визначеного розміру пор і фільтр для одержання у кінцевому підсумку визначеного розміру пор). Чим більше разів пропускання через фільтри з різним розміром частинок застосовують в екструдері, тим вище співвідношення одношарового формування, так що одержаний продукт починає розглядатися як ліпосома, яка практично складається з одношарової везикули. Ліпосома, яка практично складається з одношарової везикули, конкретно означає ліпосому з одношаровою везикулою, так що відношення одношарової везикули до всіх носіїв (везикул), які формують ліпосомний склад, може становити 50% або більше, переважно 80% або більше.

У вищеописаній ліпосомі ланцюги гідрофільного полімеру на її зовнішній поверхні розподілені зовні ліпосоми, тоді як поверхня внутрішньої водної фази -сторони внутрішнього шару ліпідного бішару не модифікована, так що ланцюги гідрофільного полімеру в основному не розподілені у внутрішній водній фазі. У випадку ліпосоми, яка має дану структуру розподілу, стабільність мембрани може бути збережена порівняно з ліпосомою, яка має гідрофільні полімери, розподілені на обох сторонах внутрішньої і зовнішньої мембран бішарової мембрани, навіть якщо значення рН внутрішньої водної фази є низьким. Крім того, можна одержати ефект стабільності у крові, навіть якщо загальна кількість гідрофільних полімерів є маленькою порівняно з ліпосомою, яка має гідрофільні полімери, розподілені на обох сторонах внутрішнього і зовнішнього шарів бішарової мембрани.

Потрібно зазначити, що термін «здатність до утримання у крові» означає властивість включеного у носій лікарського засобу бути присутнім у крові. Коли лікарський засіб вивільняється з носія, лікарський засіб швидко зникає із крові і діє на ділянку, яка зазнає впливу. Лікарський засіб, який має чудову здатність до утримання у крові, можна вводити у меншій дозі.

Носій за даним винаходом може бути присутнім у сферичній формі або у подібній формі. Розмір його частинки (зовнішній діаметр частинки) не є обмеженим конкретно, однак становить від 0,02 до 250 нм, переважно від 0,03 до 0,4 нм, більш переважно від 0,05 до 0,2 нм. Зовнішній діаметр частинки являє собою середнє значення діаметра всіх частинок у ліпосомному складі, яке визначають за допомогою способу динамічного світлового розсіювання. Конкретно, визначення можна проводити із застосуванням Zetasizer (Malvern Instruments 3000HS або S ZEM 5002).

Склад з іринотеканом за даним винаходом може додатково містити фармацевтично прийнятний стабілізатор і/або антиоксидант залежно від

способу його введення. Стабілізатор включає як необмежувальні конкретно приклади сахариди, такі як гліцерин і сахароза. Антиоксидант включає як необмежувальні конкретно приклади аскорбінової кислоти, сечову кислоту, гомологи токоферолу (наприклад, вітамін Е) і подібні. Існує чотири ізомери токоферолу (α , β , γ і δ), кожний з яких можна застосовувати за даним винаходом.

Склад з іринотеканом може додатково містити фармацевтично прийнятну домішку залежно від способу його введення. Домішка включає як необмежувальні приклади воду, фізіологічний розчин, фармацевтично прийнятний органічний розчинник, колаген, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, карбоксиполімер, натрій-карбоксиметилцелюлозу, поліакрилат натрію, альгінат натрію, водорозчинний декстран, натрій-карбоксиметилкрохмаль, пектин, метилцелюлозу, етилцелюлозу, ксантанову смолу, гуміарабік, казеїн, желатин, агар, дигліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, вазелін, парафін, стеариновий спирт, стеаринову кислоту, людський сироватковий альбумін (HSA), маніт, сорбіт, лактозу, PBS, біорозкладаний полімер, безсироваткове середовище, поверхнево-активну речовину, застосовну як фармацевтична домішка, буфер фізіологічного рН, застосовний у живому організмі, або подібні. Застосовувана домішка не є обмеженою, але її можна вибрати з вищеописаних домішок залежно від її лікарської форми, відповідно, або у сполученні з іншою домішкою.

За даним винаходом склад з іринотеканом, який містить такі домішки, можна надавати як фармацевтичну композицію. Фармацевтичну композицію за даним винаходом можна зберігати звичайним способом, наприклад, у холодильнику при температурі від 0 до 8 °C або при кімнатній температурі від 1 до 30 °C.

За даним винаходом ліпосома приймає форму з інкапсульованим CPT-11. Відомо, що α -гідроксилактонове кільце у CPT-11 схильне до гідролізу у діапазоні рН вище, ніж у нейтральних умовах. Тому у ліпосомі за даним винаходом необхідно підтримувати внутрішню водну фазу ліпосоми при кислому рН, щоб пригальмувати гідроліз α -гідроксилактонового кільця, незалежно від того, чи поміщений CPT-11 у ліпідний бішар чи у внутрішню водну фазу.

В основному відомо, що ліпід гідролізується залежно від температури або величини рН. Зокрема, відомо, що складні ефіри карбоксилату і жирної кислоти легко гідролізуються у положеннях sn-1 і sn-2 і розкладаються до лізопіліду і жирної кислоти [Grit et al., Chem. Phys. Lipids 64, 3-18, 1993]. Такі продукти розкладу порушують загальноприйнятий склад ліпідної мембрани, і проникність ліпідної мембрани поліпшується, приводячи до порушення стабільності ліпосоми. Отже, коли внутрішню водну фазу зберігають кислою, рН у зовнішній водній фазі бажаний приблизно нейтральний, з точки зору стабільності ліпиду.

Ситуацією, де дані дві протилежні умови найбільш жорстко обмежені, є стадія введення лікарського засобу. На стадії введення лікарського засобу суміш необхідно нагрівати щонайменше до

температури фазового переходу ліпідної мембрани, що значною мірою сприяє гідролізу ліпиду. Для приглушення гідролізу ліпиду бажано встановити рН у зовнішній водній фазі приблизно нейтральним. Однак, коли рН у зовнішній водній фазі встановлюють приблизно нейтральним, активізується гідроліз α -гідроксилактонового кільця у CPT-11. Зважаючи на дані дві протилежні умови значення рН у зовнішній водній фазі становить переважно від 4,0 до 8,0, більш переважно від 4,0 до 7,0, більш переважно від 5,0 до 7,0.

Для заповнення складом з іринотеканом з високим включенням за даним винаходом формують ліпосому-носій, і потім виконують спосіб, на який посилаються як на спосіб дистанційного завантаження, для введення лікарського засобу із застосуванням іонного градієнта всередині/зовні мембрани ліпосоми. Спосіб дистанційного завантаження можна застосовувати для звичайного лікарського засобу, здатного існувати у зарядженому стані, у випадку, де лікарський засіб розчиняють у відповідному водному середовищі. Коли одержаний іонний градієнт всередині/зовні ліпосоми, лікарський засіб можна інкапсулювати за допомогою проникнення через мембрану ліпосоми залежно від одержаного градієнта.

Приклади іонного градієнта, одержаного через мембрану ліпосоми, включають градієнт концентрацій Na^+/K^+ . Методика додавання лікарського засобу у попередньо сформовану ліпосому способом дистанційного завантаження для градієнта концентрацій Na^+/K^+ описана у [US 5077056] (зміст якого наведений тут як посилання), що можна здійснити відповідно до опису.

Переважні приклади іонного градієнта за даним винаходом включають градієнт концентрації протонів, і наводять приклад виду градієнта рН, сформованого встановленням значення рН зсередини мембрани (внутрішня водна фаза) нижчого, ніж значення рН зовні мембрани (зовнішня водна фаза). Конкретно, градієнт рН можна одержати на основі градієнта концентрації іона амонію і/або градієнта концентрації органічної сполуки, яка має аміногрупу, схильну до протонування.

Конкретний приклад способу інкапсуляції лікарського засобу (іринотекану або його солі) у ліпосому із застосуванням градієнта концентрації іона амонію буде описаний нижче. По-перше, попередньо формують ліпосому у водному буфері, який містить від 0,1 до 0,3М солі амонію, і зовнішнє середовище заміняють на середовище, яке не містить іонів амонію (наприклад, розчин сахарози), таким чином одержуючи градієнт іонів амонію всередині/зовні мембрани ліпосоми. Іони амонію всередині зрівноважені аміаком і протонами, і аміак проникає через ліпідну мембрану і розсіюється для усунення аміаку зсередини ліпосоми. З усуненням аміаку зрівноважену частину у ліпосомі направляють до формування протонів. У результаті у ліпосомі накопичуються протони, і формується градієнт рН всередині/зовні ліпосоми. Коли до дисперсанта ліпосоми, який має такий градієнт рН, додають лікарський засіб, лікарський засіб включається у ліпосому.

Сіль амонію, застосовна для одержання градієнта концентрації іонів амонію, включає як необхідні конкретно приклади сульфат амонію, гідроксид амонію, ацетат амонію, хлорид амонію, фосфат амонію, цитрат амонію, сукцинат амонію, лактобонат амонію, карбонат амонію, тартрат амонію та оксалат амонію.

Необхідно зазначити, що сама методика введення лікарського засобу у попередньо сформовану ліпосому способом дистанційного завантаження для градієнта концентрації іонів амонію описана у [US 5192549] (зміст якого наведений тут як посилання), що можна здійснити відповідно до опису.

Бажано, щоб органічна сполука, яка має аміногрупу, схильну до протонування, мала низьку молекулярну масу. Конкретні необмежувальні приклади включають метиламін, етиламін, пропіламін, діетиламін, етилендіамін, і подібні.

За даним винаходом відповідним є спосіб, коли іринотекан або його сіль вводять способом дистанційного завантаження із застосуванням градієнта концентрації іонів амонію.

Склад з іринотеканом за даним винаходом одержують введенням іринотекану або його солі у вищеописаний носій у концентрації, яка перевищує 0,07мол./мол. (лікарський засіб (моль)/загальний ліпід мембрани (моль)), яка переважно перевищує 0,1мол./мол.

За даним винаходом термін «включений» означає стан, коли лікарський засіб інкапсулований у носій. Термін означає також стан, де частина або всі молекули лікарського засобу включені у шар ліпиду, який є компонентом носія. Носій за даним винаходом очищають загальноприйнятим способом (таким як гель-фільтрація, діаліз, поділ на мембрані або центрифугування), таким чином видаляючи лікарські засоби, не завантажені у носій.

Носій надають після стадії видалення незавантажених лікарських засобів. Отже, може існувати градієнт концентрації через ліпідний бішар між внутрішньою і зовнішньою частинами носія. Переважно, щоб носій за даним винаходом не містив вільних лікарських засобів зовні ліпідного бішару після одержання носія. Потім поміщені у носій лікарські засоби вивільняються у зовнішню ділянку. Носій за даним винаходом із поміщенням лікарським засобом надходить до ділянки-мішені, що у результаті приводить до доставки лікарських засобів до ділянки-мішені. Доставку лікарських засобів до ділянки-мішені можна здійснювати за допомогою поглинання включених у носій лікарських засобів у ділянці-мішені або проявлення ефекту лікарського засобу у ділянці-мішені або по сусідству з нею, навіть якщо лікарський засіб не поглинається у ділянці-мішені.

За даним винаходом термін «вивільняти» означає, що лікарський засіб, поміщений у носій, дифундує назовні із замкнутої везикули за допомогою проходження через ліпідну мембрану, яка формує носій, або за допомогою зміни частини структури ліпідної мембрани. Коли гідрохлорид іринотекану зазнає метаболізму у плазмі до SN-38, який є активним метаболітом, і впливає на ділян-

ку-мішень у високій концентрації протягом тривалого часу, проявляється сильна антинеопластична активність, так що необхідно контролювати вивільнення. Швидкість вивільнення складу з іринотеканом у плазмі можна контролювати регулюванням кількості холестерину, і очікують переважного ефекту за допомогою регулювання кількості холестерину. Термін «швидкість вивільнення» означає відношення лікарського засобу, який просочується назовні із замкнутої везикули з компонентів інкапсулюючого носія і гідрохлориду іринотекану, до лікарського засобу, інкапсульованого у носії (масове відношення або молярне відношення). Фраза «швидкість вивільнення є низькою» означає, що кількість лікарського засобу, який просочується назовні із замкнутої везикули за одиницю часу, є невеликою.

За даним винаходом термін «ділянка-мішень» означає конкретну ділянку, в якій лікарський засіб, інкапсульований у носії, вивільняється і діє, і означає клітину, тканину, орган або внутрішній орган, точно визначений у кожній ділянці, та їх внутрішню частину. Ділянка-мішень, така як клітина, тканина, орган або внутрішній орган та їх внутрішня частина, може бути ділянкою, яка підлягає лікуванню лікарським засобом. Коли ділянку піддають впливу вивільненого лікарського засобу, це викликає ефект. Ділянка-мішень включає як конкретні необмежувальні приклади пухлини.

Пухлина, яка підлягає лікуванню, включає як конкретні необмежувальні приклади солідну пухлину. Конкретні приклади включають рак стравоходу, рак шлунка, рак ободової кишки, рак товстої кишки, рак прямої кишки, рак підшлункової залози, рак печінки, рак гортані, рак легені, рак передміхурової залози, рак сечового міхура, рак молочної залози, рак тіла матки і рак яєчника. Ділянка-мішень являє собою пухлинну клітину, тканину, орган або внутрішній орган, їх внутрішню частину, і подібні. Отже, за даним винаходом захворювання означає вищеописану пухлину, і очікують, що лікарський засіб справить на неї антинеопластичний ефект.

За даним винаходом термін «вплив» означає, що лікарський засіб, який вивільняється назовні з носія, діє на зовнішню ділянку. Конкретно, коли вивільнений лікарський засіб наближається до ділянки-мішені і вступає з нею у контакт, лікарський засіб проявляє антинеопластичний ефект як свою дію. Коли лікарський засіб діє на ділянку-мішень, він діє місцево на клітину у ділянці-мішені, у клітинному циклі, де відбувається синтез ДНК, так що викликає очікуваний ефект. Для викликання такого ефекту необхідно підтримувати баланс між швидкістю вивільнення лікарського засобу з носія і здатністю до утримання носія у крові.

Носій за даним винаходом вивільняє іринотекан і/або його сіль із переважною швидкістю вивільнення, і вивільнений іринотекан і/або його сіль далі зазнає метаболізму до SN-38, який є активним метаболітом. Даний винахід застосовують для впливу SN-38 на визначену ділянку-мішень протягом тривалого періоду часу. Отже, за даним винаходом для запобігання і/або лікування захворювання, яким хворіє хазяїн, системне або місцеве

введення хазяїнові (пацієнтові) можна здійснювати парентерально за допомогою введення носія, в який поміщена ефективна кількість іринотекану і/або його солі, для вивільнення ефективної кількості іринотекану і/або його солі у хазяїні, або для впливу ефективною кількістю SN-38 на ділянку-мішень у високій концентрації протягом тривалого часу. Приклади хазяїна, як мішені введення включають ссавців, переважно людей, мавп, мишей, велику рогату худобу, і подібних.

Приклади способів парентерального введення для вибору включають внутрішньовенну ін'єкцію (i.v.), таку як краплинна, внутрішньом'язову ін'єкцію, внутрішньочеревинну ін'єкцію, підшкірну ін'єкцію, і відповідний спосіб введення можна вибрати залежно від віку або симптому пацієнта. Носій за даним винаходом вводять пацієнтові, який хворіє захворюванням, у кількості, достатній для вилікування симптому захворювання або для полегшення щонайменше частини симптому. Наприклад, ефективну дозу лікарського засобу, яка підлягає інкапсуляції у носій, вибирають із діапазону від 0,01 мг до 100 мг на кг маси тіла на добу. Однак доза носія для цієї мети за даним винаходом не обмежена. Протягом періоду введення можна здійснювати після дебюту захворювання, або його можна здійснювати профілактично для полегшення симптому після дебюту у випадку, якщо завбачений дебют захворювання. Крім того, період введення можна вибрати відповідним чином залежно від віку або симптому пацієнта.

Конкретні приклади способу введення включають введення фармацевтичної композиції із застосуванням шприца або крапельниці. При цьому у тіло пацієнта або хазяїна (наприклад, порожнину або судину) вставляють катетер, направляючи його вістря поблизу ділянки-мішені, і композицію можна вводити через катетер у визначену ділянку-мішень або поблизу ділянки або у ділянку, від якої кров, як очікують, протікає через ділянку-мішень.

Як описано у прикладах, коли визначили швидкість вивільнення лікарського засобу, поміщеного у носій за даним винаходом, виявили, що швидкість вивільнення є низькою. Щоб розрахувати швидкість вивільнення, носій за даним винаходом осаджували центрифугуванням, і визначали кількість лікарського засобу, яка присутня у супернатанті та у носії.

Приклади

Далі даний винахід буде описаний більш докладно за допомогою прикладів, однак даний винахід не є обмеженим даними прикладами і тестовими прикладами.

Кожну концентрацію і розмір частинок ліпосом з інкапсульованим лікарським засобом, одержаних у кожному прикладі, визначали наступним чином.

Концентрація фосфоліпиду (мг/мл): концентрація фосфоліпиду (HSPC) у дисперсії ліпосом, визначена із застосуванням набору для визначення фосфоліпиду (Phospholipid C-Test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Загальна концентрація ліпідів (моль/л): загальна молярна концентрація (мМ) змішаного ліпиду, який є компонентом мембрани, яку обчислюють із концентрації фосфоліпиду вище. Загальні ліпіди

містять ліпідні компоненти у модифікуючому поверхню агенті, одержаному як змішаний ліпід, але не містять ліпиду (наприклад, PE (фосфатидилетаноламіну) у PEG-PE або Chol (холестерину) у Chol-PEG), у похідному PEG для введення PEG.

Концентрація лікарського засобу (мг/мл): концентрацію визначали наступним чином: склад, одержаний вище, розводили у 40 разів фізіологічним розчином, і до 50мкл суміші додавали 2мл метанолу з подальшим вимірюванням інтенсивності флуоресценції (довжина хвилі збудження: 360нм, довжина хвилі флуоресценції: 435нм) суміші із застосуванням спектрофлуориметра. Концентрація поміщеного гідрохлориду іринотекану подана як «кількість лікарського засобу (мг)/загальна кількість складу (мл)».

Кількість включеного лікарського засобу (молярне співвідношення лікарський засіб/загальні ліпіди): концентрація гідрохлориду іринотекану, поміщеного у носій, подана як молярне співвідношення лікарський засіб/загальні ліпіди, яке обчислюють із відношення концентрації лікарського засобу до концентрації ліпиду.

Розмір частинок (нм): 20мкл дисперсії ліпосом розчиняли у 3мл фізіологічного розчину і визначали середній розмір частинок за допомогою Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments).

Далі йдуть скорочені найменування і молекулярні маси застосовуваних компонентів.

HSPC: гідрогенізований соєвий фосфатидилхолін (молекулярна маса: 790, виготовлений Lipoid, SPC3)

Chol: холестерин (молекулярна маса: 386,65, Solvay)

PSG₅₀₀₀-PE: поліетиленгліколь (молекулярна маса: 5000)-фосфатидилетаноламін (молекулярна маса: 5938, Genzyme Corporation)

PEG₂₀₀₀-PE: поліетиленгліколь (молекулярна маса: 2000)-фосфатидилетаноламін (молекулярна маса: 2725, NOF Corporation)

PEG₁₆₀₀-Chol: поліетиленгліколь (молекулярна маса: 1600)-холестерин (молекулярна маса: 1982, NOF Corporation)

CPT-11: гідрохлорид іринотекану (молекулярна маса: 677,19)

R-DHPE: родамін-
дигексадеканоїлфосфатидилетаноламін (молекулярна маса: 1333,81, Molecular Probes, Inc.)

TRX-20: 3,5-дипентадецилоксибензамідину гідрохлорид (молекулярна маса: 609,41, Joko Pharmaceutical Co., Ltd.)

[Приклад 1]

Щоб підтвердити спосіб, яким можна одержати ліпосомний склад з високою інкапсуляцією гідрохлориду іринотекану, здійснювали введення лікарського засобу у високій концентрації способом дистанційного завантаження (приклад одержання 1) або способом пасивного завантаження (порівняльний приклад одержання 1). Для всіх ліпосомних складів, які включають гідрохлорид іринотекану (далі скорочені як склад з CPT-11), як носій застосовували ліпосому PGE-PE (пост-введення), хоча способи введення були різними.

(Приклад одержання 1) <Спосіб дистанційного завантаження>

(1) Одержання змішаного ліпиду: 0,422г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC) і 0,176г холестерину (Chol) розчиняли у 25мл t-бутанолу (Kanto Kagaku), нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували на льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol - 54:46 (молярне співвідношення).

(2) Одержання ліпосом: до 0,598г змішаного ліпиду, одержаного раніше, додавали 10мл 250мМ розчину сульфату амонію, і дозволяли ліпиду повністю набухнути. Потім суміш перемішували на змішувачі зі струшуванням, і одержану суміш послідовно пропускали через фільтр (розмір пор: 0,2мкм×5 разів, 0,1мкм×10 разів, Whatman), приєднаний до екструдера (Extruder T. 10, biomembranes Inc.), при 68°C, щоб таким чином одержати дисперсію ліпосом.

(3) Введення PEG-PE: до одержаної дисперсії ліпосом додавали 1,21мл (відповідає кількості змішаного ліпиду 0,75%мол. від загальних ліпідів) розчину поліетиленгліколь 5000-фосфатидилетаноламіну (PEG5000-PE) у дистильованій воді (36,74мг/мл), і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин, щоб таким чином ввести PEG5000-PE.

Заміну зовнішньої водної фази проводили із застосуванням гелевої колонки, призначеної для заміни розчинника розчином 10мМ гістидину/10% сахарози (pH6,0).

Концентрацію HSPC визначали із застосуванням набору для визначення фосфоліпиду. Кількість загальних ліпідів (мМ) обчислювали із концентрації HSPC.

(4) Інкапсуляція лікарського засобу: одержували розчин гідрохлориду іринотекану (CPT-11) у RO-воді (вода, очищена на мембрані зворотним осмосом) з концентрацією 10мг/мл.

До дисперсії ліпосом додавали розчин гідрохлориду іринотекану у кількості CPT-11/HSPC=0,2 (мас/мас.) для концентрації HSPC (мг/мл) вказаної вище, і суміш перемішували при 60°C протягом 60 хвилин, щоб таким чином ввести гідрохлорид іринотекану. Після введення зразок охолоджували на льоді. Після інкапсуляції гідрохлориду іринотекану, дисперсію ліпосом пропускали через гелеву колонку, призначену для заміни розчинника, з розчином 10мМ гістидину/10% сахарози (pH6,5) для видалення неінкапсульованих лікарських засобів.

Склади і розміри частинок складів з CPT-11, одержаних вище, показані у таблиці 1.

Одержаніклади з високою інкапсуляцією CPT-11 за даним винаходом.

(Порівняльний приклад одержання 1) <Спосіб пасивного завантаження>

До 0,2992г змішаного ліпиду (HSPC:Chol=54:46 (молярне співвідношення)), одержаного таким же способом, як у прикладі одержання 1, додавали 5мл розчину гідрохлориду іринотекану (CPT-11/10% розчин сахарози з концентрацією 10мг/мл), і дозволяли ліпиду повністю набухнути. Суміш перемішували на змішувачі зі струшуванням, і одержану суміш послідовно пропускали через фільтр (0,2мкм×5 разів, 0,1мкм×10 разів), приєднаний до екструдера, при 68°C таким же способом, як у при-

кладі одержання 1, щоб таким чином одержати ліпосому, яка інкапсулює гідрохлорид іринотекану.

До ліпосоми додавали 0,61мл (відповідає кількості змішаного ліпідів) PEG₅₀₀₀-PE таким же способом, як у прикладі одержання 1 (3), і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин, щоб таким чином ввести PEG₅₀₀₀-PE. Потім неінкапсульовані лікарські засоби видаляли із застосуванням гелевої колонки, призначеної для заміни розчинника, з розчином 10мМ гістидину/10% сахарози (pH6,5).

Склади і розміри частинок складів з CPT-11, одержаних вище, показані у таблиці 1.

Лікарський засіб вводили у тій же кількості лікарського засобу, як у прикладі одержання 1, але способом пасивного завантаження не одержали складів з високою інкапсуляцією CPT-11.

[Приклад 2]

Досліджували початкову кількість, необхідну для одержання складу з високою інкапсуляцією CPT-11 за даним винаходом, способом дистанційного завантаження.

(Приклад одержання 2)

Повторювали процедуру із приклада одержання 1, за винятком того, що при інкапсуляції лікарського засобу, описаній у прикладі одержання 1 (4), співвідношення CPT-11/HSPC (мас/мас.) з розчином CPT-11 у RO-воді (10мг/мл), для додавання до дисперсії ліпосом з пост-введенням PGE-PE, одержаної таким же способом, як від (1) до (3), змінювали на 0,1, 0,2, 0,4 і 0,8, щоб таким чином одержати склади з CPT-11. Склади і розміри частинок складів з CPT-11, одержаних вище, показані у таблиці 1.

Як показано у таблиці 1, склади, які добре підтримують (інкапсулюють) CPT-11 з лікарським засобом у повністю ефективній концентрації для клінічного застосування, можна одержати способом дистанційного завантаження за допомогою збільшення кількості початкової кількості лікарського засобу (співвідношення лікарський засіб/HSPC).

Таблиця 1

Приклад одержання	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Початкова кількість лікарського засобу	Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кількість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	PEG-PE	Фосфоліпід HSPC	Загальні ліпіди	CPT-11/HSPC мас./мас.	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загального ліпиду	нм
	HSPC/Chol		мг/мл	моль/л				
Приклад одержання 1	54/46	0,75	12,6	0,03	0,2	2,41	0,11712	120,9
Порівняльний приклад одержання			13,73	0,032	0,2	0,29	0,013	120,8
Приклад одержання								
2-(1)			11,37	0,027	0,1	1,32	0,073	125,2
2-(2)			8,98	0,021	0,2	1,88	0,132	124,8
2-(3)			7,08	0,017	0,4	2,99	0,266	123,1
2-(4)			4,54	0,011	0,8	2,96	0,41	126,5

(Тестовий приклад 1) Збільшена стабільність складу при 37°C Кожний зі складів з CPT-11, одержаних у прикладі 1, нагрівали при 37°C протягом визначеного періоду. Після нагрівання склад з CPT-11 розчиняли у 20 разів додаванням фізіологічного розчину і проводили ультрацентрифугування (1×10^5g , 2 години, 10°C) для осадження складу з CPT-11 (ліпосоми, яка інкапсулює гідрохлорид іринотекану). Кількість гідрохлориду іринотекану, яка присутня у супернатанті, визначали для обчислення швидкості вивільнення (%) гідрохлориду іринотекану зі складу з CPT-11. Результати показані на Фіг.1.

Виявлено, що склад з CPT-11, одержаний у порівняльному прикладі одержання 1, має швидкість вивільнення гідрохлориду іринотекану приблизно 60% після нагрівання при 37°C протягом 7 діб, у той час як виявлено, що склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 1 способом дистанційного завантаження, вивільняє мало гідрохлориду іринотекану навіть після нагрівання при 37°C протягом 7 діб. Отже, з'ясували, що інкапсуляція гідрохлориду іринотекану у ліпосому спосо-

бом дистанційного завантаження дозволяє одержання добре підтримуючого CPT-11 складу з чудовою стабільністю складу.

(Тестовий приклад 2) Стабільність складу при 37°C

Кожний склад з CPT-11, одержаний у прикладі 2, нагрівали при 37°C протягом визначеного періоду. Після нагрівання для складу з CPT-11 визначали швидкість вивільнення гідрохлориду іринотекану таким же способом, як у тестовому прикладі 1. Виявили, що швидкість вивільнення з кожного складу з CPT-11 становить 1% або менше навіть після нагрівання при 37°C протягом 14 діб.

Отже, з'ясували, що на швидкість вивільнення складу з CPT-11, одержаного способом дистанційного завантаження, сильно не впливає кількість лікарського засобу, який міститься, (співвідношення лікарський засіб/загальні ліпіди), і навіть склад з надзвичайно високою інкапсуляцією CPT-11 має чудову стабільність складу.

[Приклад 3]

Ліпосому, яка має мембранний склад, відмінний від приклада одержання 1, застосовували як

носії для одержання складу з CPT-11. Конкретно, процедуру для інкапсуляції гідрохлориду іринотекану проводили способом дистанційного завантаження таким же чином, як у прикладі одержання 1 із застосуванням ліпосоми PEG-PE з пост-введенням (приклад одержання 3) або ліпосоми PEG-PE з пре-введенням (контрольний приклад одержання 1), яка містить як компонент мембрани змішаний ліпід, показаний нижче. (Приклад одержання 3)

(1) Одержання змішаного ліпиду: 1,5317г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC), 0,6419г холестерину (Chol) і 0,005г родамін-дигексадеканойлфосфатидилетаноламіну (R-DHPE) розчиняли у 50мл t-бутанолу, нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували у льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід з молярним співвідношенням HSPC:Chol:R-DHPE - 54:46:0,1.

(2) Одержання ліпосоми: додавання 10мл 250мМ розчину сульфату амонію, перемішування на змішувачі зі струшуванням і фільтрування через фільтр, приєднаний до екструдера (0,2мм×5 разів, 0,1мм×10 разів), проводили таким же способом, як у прикладі одержання 1, за винятком того, що застосовували 0,37г змішаного ліпиду, одержаного вище, таким чином одержуючи дисперсію ліпосом.

Потім проводили заміну зовнішньої водної фази розчином 10мМ гістидину/10% сахарози (pH6,0).

(3) Введення PEG-PE: до одержаної дисперсії ліпосом додавали розчин поліетиленгліколю 2000-фосфатидилетаноламіну (PEG2000-PE) у дистильованій воді (36,74мг/мл) (відповідає 2,8%мол. від загальної кількості ліпідів), і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин, щоб таким чином ввести PEG₂₀₀₀-PE.

(4) Таким же способом, як при інкапсуляції лікарського засобу у прикладі одержання 1, 10мг/мл розчину CPT-11/RO-вода додавали до дисперсії ліпосом у кількості, необхідній для CPT-

11/HSPC=0,2 (мас/мас.) для введення рдрохлориду іринотекану. Потім суміш охолоджували у льоді, і неінкапсульовані лікарські засоби видаляли розчином 10мМ гістидину/10% сахарози (pH6,5). Одержаний склад з CPT-11 показаний у таблиці 2.

(Контрольний приклад одержання 1)

Повторювали процедуру приклада одержання 3, за винятком того, що PEG2000-PE для додавання у прикладі одержання 3 (3) попередньо додавали до змішаного ліпиду як мембранний компонент для одержання ліпосоми з PEG-PE, розподілений на обох сторонах внутрішньої і зовнішньої мембран, щоб таким чином одержати склад з CPT-11. Процедура показана нижче.

До 0,37г змішаного ліпиду (HSPC:Chol:R-DHPE=54:46:0,1 (молярне співвідношення)), одержаного таким же способом, як у прикладі одержання 3 (1), і 0,094г (що відповідає кількості (5,6%мол.) у два рази більшій кількості у прикладі одержання 3) PEG₂₀₀₀-PE додавали 1мл етанолу, і суміш повністю розчиняли перемішуванням при 65°C протягом 30 хвилин.

Після підтвердження, що суміш розчинилася повністю при перемішуванні, до розчину етанолу додавали 10мл розчину сульфату амонію, приготовленого так, щоб бути 250мМ. Потім проводили такі ж процедури, як у прикладі одержання, 3 (2) зі струшувальним змішувачем та екструдером, і проводили заміну зовнішньої водної фази для дисперсії ліпосом, одержаної із застосуванням 10% розчину сахарози.

Тим же способом, як у прикладі одержання 3 (4), 10мг/мл розчину CPT-11/RO-вода додавали до дисперсії ліпосом у кількості, необхідній для значення CPT-11/HSPC=0,2 (мас/мас.), для введення гідрохлориду іринотекану. Після введення суміш охолоджували у льоді, і неінкапсульовані лікарські засоби видаляли таким же способом, як у прикладі одержання 3 (4). Одержаний склад з CPT-11 показаний у таблиці 2.

Таблиця 2

	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кількість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	PEG-PE	Фосфоліпід HSPC	Загальні ліпіди	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загального ліпиду	нм
	HSPC:Chol:R-DHPE		мг/мл	моль/л			
Приклад одержання 3	54:46:0,1	2,8	8,12	0,019	1,52	0,114	123,6
Контрольний приклад одержання 1	54:46:0,1	5,6	6,88	0,016	1,21	0,107	102,3

(Тестовий приклад 3) Збільшена стабільність складу при 37°C

Для кожного зі складів з CPT-11, одержаних у прикладі 3, проводили тест на поліпшення за допомогою нагрівання при 37°C протягом 1 місяця. Аліквоту складу з CPT-11, який нагрівається, відбирали кожний 1 тиждень і розводили у 20 разів додаванням фізіологічного розчину з подальшим ультрацентрифугуванням (1×10⁵g, 2 години, 10°C) для осадження складу з CPT-11. Інтенсивність флуоресценції, яка відповідає кількості гідрохло-

риду іринотекану, присутній у супернатанті, визначали для обчислення швидкості вивільнення з ліпосоми (%). Результати показані на Фіг.2. При цьому розмір частинок ліпосоми у дисперсії, яка нагрівається, вимірювали кожний 1 тиждень. Результати показані на Фіг.3.

На Фіг.2 і 3 показано, що ліпосома, одержана у прикладі одержання 3, не вивільняє лікарський засіб при 37°C навіть через 1 місяць (Фіг.2) і має в основному постійний розмір частинок (Фіг.3), так що має чудову стабільність складу. З іншого боку,

для ліпосоми PEG-PE із пре-введенням, одержаної у контрольному прикладі одержання 1, вивільнення лікарського засобу при 37°C починалося на третьому тижні, швидкість вивільнення на четвертому тижні була надзвичайно високою (Фіг.2), і розмір частинок збільшувався з третього тижня (Фіг.3), так що припустили, що з третього тижня відбувається порушення мембрани.

З даних результатів виявлено, що для складу, який добре підтримує CPT-11 за даним винаходом, ліпосома PEG-PE з пост-введенням, одержана додаванням PEG-PI після формування ліпосоми, має переважну форму.

[Приклад 4]

Щоб перевірити довгочасну стабільність при зберіганні і стабільність у крові складу з CPT-11 за даним винаходом, склади з CPT-11 одержували способами прикладів одержання 4 і 5 нижче.

(Приклад одержання 4)

Лікарський засіб вводили способом дистанційного завантаження, так само як у прикладі одержання 1, за винятком того, що заміну зовнішньої водної фази для дисперсії ліпосом PEG-PE з пост-введенням проводили із застосуванням гелевої колонки, призначеної для заміни розчинника розчином 10мМ MES/10% сахарози (рН6,0) у прикладі одержання 1 (3), щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11. Склади показані у таблиці 3.

(Приклад одержання 5)

Повторювали процедуру приклада одержання 4, за винятком того, що змішаний ліпід, одержаний у (1) нижче, застосовували як компонент мембрани, щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11, який містить гідрохлорид 3,5-

дипентадецилоксибензамідину, який є зарядженою речовиною. Процедура показана нижче.

(1) Одержання змішаного ліпиду: 0,4561г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC), 0,1876г холестерину (Chol) і 0,0563г гідрохлориду 3,5-дипентадецилоксибензамідину (TRX-20) розчиняли у 25мл t-бутанолу, нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували на льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol:TRX-20=50:42:8 (молярне співвідношення).

Повторювали процедуру приклада одержання 1 (2), за винятком того, що застосовували 0,700г змішаного ліпиду, одержаного вище, щоб таким чином одержати дисперсію ліпосом.

До дисперсії ліпосом додавали 1,42мл (відповідає кількості змішаного ліпиду 0,75%мол. від загальних ліпідів) розчину PEG₅₀₀₀-PE у дистильованій воді (36,74мг/мл) для введення PEG₅₀₀₀-PE. Потім вводили лікарський засіб способом дистанційного завантаження таким же чином, як у прикладі одержання 1 (3), за винятком того, що проводили заміну зовнішньої водної фази дисперсії ліпосом розчином 10мМ MES/10% сахарози (рН6,0), щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11. Склад показаний у таблиці 3.

(Тестовий приклад 4) Тест на стабільність при довгочасному зберіганні при 4°C

Кожний зі складів з CPT-11, одержаних вище, зберігали при 4°C протягом визначеного періоду. Після закінчення визначеного періоду розмір частинок складу з CPT-11 і швидкість вивільнення (%) гідрохлориду іринотекану зі складу з CPT-11 вимірювали таким же способом, як у тестовому прикладі 1. Результати показані у таблиці 3.

Таблиця 3

Початковий склад мембрани. Молярне співвідношення	Ліпід	Приклад одержання 4	Приклад одержання 5
		HSPC/Chol	HSPC/Chol/TRX-20
Концентрація ліпиду	PEG-PE	54/46	50/42/8
	Фосфоліпідмг/мл	0,75	0,75
Концентрація лікарського засобу	Загальний ліпід моль/л	12,02	11,77
	мг/мл	0,028	0,03
Підтримувана кількість лікарського засобу	мг/мл	2,67	2,41
Розмір частинок НМ	моль лікарського засобу/моль загального ліпиду	0,136	0,119
	Початково	126,3	123,3
Швидкість вивільнення %	Після 6-місячного зберігання	122,2	125,4
	Початково	0,63	0,12
	Після 6-місячного зберігання	0,38	0,17

Для кожного зі складів з CPT-11, одержаних у прикладі 4 вище, розмір частинок і швидкість вивільнення не змінювалися навіть після 6-місячного зберігання при 4°C. Отже, з'ясували, що кожний склад з CPT-11, одержаний способом дистанційного завантаження, має чудову довгочасну стабільність при зберіганні.

(Тестовий приклад 5) Здатність до утримування у крові

Кожний склад з CPT-11, одержаний у прикладі 4 (приклади одержання 4 і 5), або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (який містить 1мг/мл гідрохлориду іринотекану) внутріш-

ньою ін'єктували у хвіст миші (BALB/c, самка, вік 5 тижнів, CLEA Japan, Inc.) з кількістю гідрохлориду іринотекану 10мг/кг (відповідає 8,77 г/кг у переведенні на кількість іринотекану).

Кров відбирали через 1, 6 і 24 години після ін'єкції і центрифугували (3000об./хв., 10 хвилин, 4°C) для збору плазми. Концентрацію гідрохлориду іринотекану у кожній плазмі вимірювали за допомогою вимірювання інтенсивності флуоресценції. До вимірювання плазму зберігали у холодильнику. Результати показані у таблиці 4 і на Фіг.4.

У випадку кожного складу з CPT-11, одержаного у прикладі 4, концентрацію гідрохлориду іринотекану у плазмі можна вимірювати до 24 годин після ін'єкції у хвостову вену, у той час як у випадку розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині, концентрацію можна вимірювати тільки 1 годину після ін'єкції у хвостову вену.

Отже, склад з CPT-11, одержаний способом дистанційного завантаження, здатний підтримувати концентрацію гідрохлориду іринотекану у плазмі з високою концентрацією протягом тривалого періоду часу.

Таблиця 4

Час, який минув (годин)	Концентрація у плазмі (мкг/мл)		
	1	6	24
Склад з CPT-11 (приклад одержання 4)	189,41	128,03	13,18
Склад з CPT-11, який містить TRX-20 (приклад одержання 5)	185,29	84,67	3,38
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	0,39	ND	ND

[Приклад 5]

Щоб протестувати ефективність лікарського засобу зі складу з високою інкапсуляцією CPT-11 за даним винаходом, склади з CPT-11 одержували у прикладах одержання 6-9 нижче.

(Приклад одержання 6)

Повторювали процедуру приклада одержання 4, за винятком того, що змішаний ліпід, одержаний у (1) нижче, застосовували як компонент мембрани, щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11, який містить гідрохлорид 3,5-дипентадецилоксибензамідину, який є зарядженою речовиною. Процедура показана нижче.

(1) Одержання змішаного ліпиду: 4,562г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC), 1,876г холестерину (Chol) і 0,564г гідрохлориду 3,5-дипентадецилоксибензамідину (TRX-20) розчиняли у 50мл t-бутанолу, нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували на льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol:TRX-20=50:42:8 (молярне співвідношення).

зацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol:TRX-20=50:42:8 (молярне співвідношення).

Повторювали процедуру приклада одержання 1, за винятком того, що застосовували 7,002г змішаного ліпиду, одержаного вище, щоб таким чином одержати дисперсію ліпосом.

До дисперсії ліпосом додавали розчин поліетиленгліколю 5000-фосфатидилетаноламіну (PEG₅₀₀₀-PE) у дистильованій воді (36,74мг/мл), що відповідає 0,75%мол. кількості загальних ліпідів, і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин для введення PEG₅₀₀₀-PE. Потім вводили лікарський засіб способом дистанційного завантаження таким же чином, як у прикладі одержання 1 (4), щоб таким чином одержати склад з високою інкапсуляцією CPT-11.

Склад показаний у таблиці 5.

Таблиця 5

	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кількість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	PEG-PE	Фосфоліпід	Загальний ліпід	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загального ліпиду	нм
	HSPC:Chol:TRX-20		мг/мл	моль/л			
Приклад одержання 6	50:42:8	0,75	18,36	0,047	3,66	0,115	134,3

(Приклад одержання 7)

Повторювали процедуру приклада одержання 4, за винятком того, що змішаний ліпід, одержаний у (1) нижче, застосовували як компонент мембрани, щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11, який містить гідрохлорид 3,5-дипентадецилоксибензамідину, який є зарядженою речовиною. Процедура показана нижче.

(1) Одержання змішаного ліпиду: 4,562г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC), 1,518г холестерину (Chol) і 1,126г гідрохлориду 3,5-дипентадецилоксибензамідину (TRX-20) розчиняли у 50мл t-бутанолу, нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували на льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol:TRX-20=50:34:16 (молярне співвідношення).

Повторювали процедуру приклада одержання 1, за винятком того, що застосовували 7,207г змішаного ліпиду, одержаного вище, щоб таким чином одержати дисперсант ліпосоми.

До дисперсії ліпосом додавали розчин поліетиленгліколю 1600-холестерину (PEG₁₆₀₀-Chol) у дистильованій воді (36,74мг/мл), що відповідає 2,0%мол. кількості загальних ліпідів, і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин для введення PEG₁₆₀₀-Chol. Потім вводили лікарський засіб способом дистанційного завантаження таким же чином, як у прикладі одержання 1 (4) за винятком того, що проводили заміну зовнішньої водної фази дисперсії ліпосом розчином 10mM MES/10% сахарози (pH6,0), щоб таким чином одержати склад з високою інкапсуляцією CPT-11. Склад показаний у таблиці 6.

Таблиця 6

	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кіль- кість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	Chol-PEG	Фосфоліпід	Загальний ліпід	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загаль- ного ліпиду	нм
	HSPC:Chol:TRX-20		мг/мл	моль/л			
Приклад одержання 7	50:34:16	2	15,78	0,041	3,26	0,119	133,7

(Приклад одержання 8)

Повторювали процедуру приклада одержання 4, за винятком того, що змішаний ліпід, одержаний у (1) нижче, застосовували як компонент мембрани, щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11, який містить гідрохлорид 3,5-дипентадецилоксибензамідину, який є зарядженою речовиною. Процедура показана нижче.

(1) Одержання змішаного ліпиду: 4,562г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC), 1,376г холестерину (Chol) і 0,564г гідрохлориду 3,5-дипентадецилоксибензамідину (TRX-20) розчиняли у 50мл t-бутанолу, нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували на льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol:TRX-20 - 50:42:8 (молярне співвідношення).

Повторювали процедуру приклада одержання 1, за винятком того, що застосовували 7,002г змішаного ліпиду, одержаного вище, щоб таким чином одержати дисперсію ліпосом.

До дисперсії ліпосом додавали розчин поліетиленгліколю 5000-фосфатидилетаноламіну (PEG₅₀₀₀-PE) у дистильованій воді (36,74мг/мл), що відповідає 0,75%мол. кількості загальних ліпідів, і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин для введення PEG₅₀₀₀-PE. Потім вводили лікарський засіб способом дистанційного завантаження таким же чином, як у прикладі одержання 1 (4), щоб та-

ким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11. Склад показаний у таблиці 6.

(Приклад одержання 9)

Повторювали процедуру приклада одержання 4, за винятком того, що змішаний ліпід, одержаний у (1) нижче, застосовували як компонент мембрани, щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11. Процедура показана нижче.

(1) Одержання змішаного ліпиду: 4,940г гідрогенізованого соєвого фосфатидилхоліну (HSPC) і 2,060г холестерину (Chol) розчиняли у 50мл t-бутанолу, нагрітого до 60°C, і суміш охолоджували на льоді з подальшою ліофілізацією, щоб таким чином одержати змішаний ліпід HSPC:Chol=54:46 (молярне співвідношення).

Повторювали процедуру приклада одержання 1, за винятком того, що застосовували 7,002г змішаного ліпиду, одержаного вище, щоб таким чином одержати дисперсію ліпосом.

До дисперсії ліпосом додавали розчин поліетиленгліколю 5000-фосфатидилетаноламіну (PEG₅₀₀₀-PE) у дистильованій воді (36,74мг/мл), що відповідає 0,75%мол. кількості загальних ліпідів, і суміш нагрівали при 60°C протягом 30 хвилин для введення PEG₅₀₀₀-PE. Потім вводили лікарський засіб способом дистанційного завантаження таким же чином, як у прикладі одержання 1 (4), щоб таким чином одержати склад, який добре підтримує CPT-11. Склад показаний у таблиці 7.

Таблиця 7

	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кіль- кість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	PEG-PE	Фосфоліпід	Загальний ліпід	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загаль- ного ліпиду	нм
	HSPC:Chol:TRX-20		мг/мл	моль/л			
Приклад одержання 8	50:42:8	0,75	19,04	0,049	3,22	0,098	121,6
Приклад одержання 9	54:46:0	0,75	19,66	0,045	3,28	0,107	119,9

[Приклад 6]

Перевіряли вплив значення pH у зовнішній водній фазі на швидкість інкапсуляції лікарського засобу. (Приклад одержання 10)

(1) Одержання змішаного ліпиду: зважували 7,01г HSPC і 2,93г Chol, і додавали до них 10мл абсолютного етанолу. Потім їх розчиняли при 68°C. Після підтвердження, що вони повністю розчинилися, до них додавали 90мл розчину сульфату амонію (250ММ), і суміш перемішували при нагріванні при 68°C.

(2) Одержання ліпосом: після завершення перемішування з нагріванням одержану суміш пропускали через фільтр із розміром пор 0,2мкм п'ять разів із застосуванням екструдера, нагрітого до 68°C. Потім фільтр заміняли фільтром з розміром пор 0,1мкм, і фільтрат пропускали через фільтр п'ять разів. Потім фільтр знову заміняли фільтром з розміром пор 0,1мкм, і фільтрат пропускали через фільтр п'ять разів. Введення PEG₅₀₀₀-DSPE: після екструзії до зразка додавали 20,4мл розчину PEG₅₀₀₀-DSPE (36,74мг/мл) так, щоб вміст PEG₅₀₀₀-SSPE (%мол.) був визначеним, і суміш

перемішували при 60°C протягом 30 хвилин, щоб таким чином ввести PEG5000-DSPE. Після введення зразок охолоджували на льоді.

(3) Заміна зовнішньої водної фази: для кожного льодяного зразка (8мл) проводили заміну зовнішньої водної фази із застосуванням гелевої колонки, призначеної для відповідної заміни кожним з розчинів зовнішньої водної фази з різними значеннями рН (рН 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 або 9,0), конкретно, розчинами зовнішньої водної фази з рН 4,0, 5,0 (розчинами 10мМ оцтової кислоти/10% сахарози), розчином зовнішньої водної фази з рН 6,0 (розчином 10мМ гістидину/10% сахарози), розчинами зовнішньої водної фази з рН 7,0, 8,0, 9,0 (розчинами 10мМ Трис/10% сахарози). Після заміни зовнішньої водної фази кожну концентрацію HSPC для дисперсії ліпосом визначали із застосуванням набору для визначення фосфоліпиду. Загальну кількість фосфоліпиду (мМ) розраховували по концентрації HSPC.

(4) Інкапсуляція лікарського засобу: одержували розчин гідрохлориду іринотекану (CPT-11)/RO-води (вода, очищена на мембрані зворотним осмосом) з концентрацією 10мг/мл. До дисперсії ліпосом додавали розчин гідрохлориду іринотекану у кількості CPT-11 /кількість загальних ліпідів =0,16 (мол./мол.) у відношенні до кількості загальних ліпідів (мМ) вказаної вище, і суміш перемішували при 60°C протягом 60 хвилин, щоб таким чином ввести гідрохлорид іринотекану. Після введення зразок охолоджували на льоді. Після інкапсуляції

гідрохлориду іринотекану дисперсію ліпосом пропускали через гелеву колонку, призначену для заміни розчином 10мМ гістидину/10% сахарози (рН6,5) для видалення неінкапсульованих лікарських засобів.

Концентрація ліпиду (HSPC), концентрація лікарського засобу (CPT-11) і розмір частинок для кожного складу з CPT-11, одержаного вище, показані у таблиці 8.

(Ефективність інкапсуляції лікарського засобу)

Для кожного складу з CPT-11, одержаного вище, ефективність інкапсуляції лікарського засобу (%) обчислювали зі співвідношення кінцевої концентрації лікарського засобу CPT-11 відносно початкової концентрації лікарського засобу 0,16 (мол./мол.) відповідно до наступного рівняння.

[Математична формула 1]

Ефективність інкапсуляції CPT-11(%)={кінцевий CPT-11/загальні ліпіди (мол./мол.)}/{початковий CPT-11/загальні ліпіди (мол./мол.)}×100.

Результати показані у таблиці 8 і на Фіг.5. У таблиці і на фігурі показане наступне: у випадку, де значення рН зовнішньої водної фази становить 8,0 або менше, ефективність інкапсуляції CPT-11 (%) є надзвичайно високою величиною 90% або більшою, у той час як, де значення становить більше 8,0, ефективність інкапсуляції CPT-11 (%) зменшується.

Таблиця 8

рН зовнішньої водної фази	Концентрація HSPC (мг/мл)	Концентрація CPT-11 (мг/мл)	Початковий CPT-11 /Загальний ліпід (мол./мол.)	Кінцевий CPT-11/Загальний ліпід (мол./мол.)	Ефективність інкапсуляції (%)	Розмір частинок (нм)
4	11,4	2,9	0,16	0,163	101,9	121,5
	12,5	3,2		0,159	99,4	123,8
5	12,7	3,3		0,164	102,5	122,6
	12,5	3,1		0,157	98,1	124,0
6	13,0	3,2		0,154	96,3	123,5
	14,3	3,4		0,151	94,4	122,9
7	12,1	3,1		0,158	98,8	124,7
	13,7	3,2		0,148	92,5	122,4
8	13,3	3,1		0,147	91,9	124,1
	13,6	3,2		0,148	92,5	123,8
9	12,4	2,4		0,120	75,0	121,4
	12,8	2,3		0,115	71,9	124,1

[Приклад 7]

Вивчали вплив значення рН зовнішньої водної фази на стабільність лікарського засобу.

До 1мл кожної зовнішньої водної фази з різними значеннями рН, конкретно, до розчинів зовнішньої водної фази з рН 4,0, 5,0 (розчинів 10мМ оцтової кислоти/10% сахарози), розчину зовнішньої водної фази з рН6,0 (розчину 10мМ гістидину/10% сахарози), розчинів зовнішньої водної фази з рН 7,0, 8,0, 9,0 (розчинів 10мМ Трис/10% сахарози) (рН 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 або 9,0), які застосовували у (3) приклада одержання 10, додавали 0,7мл роз-

чину гідрохлориду іринотекану (CPT-11)/RO-води (вода, очищена на мембрані зворотним осмосом) з концентрацією 10мг/мл, і суміш перемішували при 60°C протягом 60 хвилин.

Розчин CPT-11, одержаний вище, розводили у 20 разів кожним з розчинів зовнішньої водної фази, і 5мкл зразка піддавали вимірюванню високо-ефективною рідинною хроматографією. Потім ступінь гідролізу (співвідношення присутності відкритої кільцевої форми) (%) α-гідроксилактонового кільця обчислювали за наступним рівнянням.

співвідношення присутності відкритої кільцевої форми CPT-11 (%) =

$$\{A_{\text{відкритої}}/A_{\text{відкритої}}+1,102 \times A_{\text{замкнутої}}\} \times 100$$

$A_{\text{відкритої}}$: Площа піка відкритої кільцевої форми CPT-11

$A_{\text{замкнутої}}$: Площа піка замкнутої кільцевої форми CPT-11

Результати показані на Фіг.5.

З'ясували, що у випадку, де значення pH зовнішньої водної фази становить 8,0 або більше, співвідношення присутності відкритої кільцевої форми CPT-11 (%) збільшене і становить надзвичайно велике значення 95% або більше. Щоб підтримувати активність CPT-11, потрібне значення pH 4,0 або менше для пригнічення гідролізу α -гідроксилactoнового кільця. Однак, з аспекту стабільності ліпиду (гідролізу ліпиду), бажаним є значення pH приблизно 6,0-7,0. Беручи до уваги результати приклада 6, виявили, що при введенні лікарського засобу бажаним є значення pH зовнішньої водної фази приблизно 4,0-7,0.

[Приклад 8]

(Приклад одержання 11)

(1) Одержання ліпосоми

Зважували 70,87г HSPC і 29,13г Chol, і додавали до них 100мл абсолютного спирту. Потім їх розчиняли з нагріванням при 68°C. Після підтвердження, що вони розчинилися повністю, до них додавали 900мл розчину сульфату амонію (250мМ), і суміш перемішували з нагріванням при 68°C.

(2) Регуляція розміру частинок ліпосоми

Регуляція розміру частинок ліпосоми: після завершення перемішування з нагріванням одержану суміш пропускали через фільтр із розміром пор 100нм п'ять разів із застосуванням екструдера, нагрітого до 68°C.

Введення PEG₅₀₀₀-DSPE: після екструзії до зразка додавали 200мл розчину PEG₅₀₀₀-DSPE (36,74мг/мл) так, щоб одержати визначений вміст PEG₅₀₀₀-DSPE (%мол.), і перемішували суміш при 60°C протягом 30 хвилин, щоб таким чином ввести PEG₅₀₀₀-DSPE. Після введення зразок охолоджували на льоді.

(3) Заміна зовнішньої водної фази

Для льодяного зразка проводили заміну зовнішньої водної фази із застосуванням системи для фільтрації з перехресним потоком на розчин зовнішньої водної фази (10мМ гістидин/10% сахароза) (pH6,5). Після заміни зовнішньої водної фази концентрацію HSPC і концентрацію холестерину визначали високоефективною рідинною хроматографією. Кількість гідрохлориду іринотекану, який підлягає інкапсуляції, розраховували по підсумовуванню концентрації HSPC і концентрації холестерину як концентрації загального ліпиду.

(4) Інкапсуляція лікарського засобу

Одержували розчин гідрохлориду іринотекану (CPT-11) у RO-воді (вода, очищена на мембрані зворотним осмосом) з концентрацією 10мг/мл. До дисперсії ліпосом додавали розчин гідрохлориду іринотекану у кількості CPT-11/кількість загальних ліпідів = 0,16 (мол./мол.) у відношенні до кількості загальних ліпідів (мМ) вказаної вище, і суміш перемішували при 50°C протягом 20 хвилин, щоб таким чином ввести гідрохлорид іринотекану. Після введення зразок охолоджували на льоді.

(5) Видалення неінкапсульованого лікарського засобу

Після інкапсуляції гідрохлориду іринотекану, до дисперсії ліпосом додавали розчин зовнішньої водної фази і проводили видалення неінкапсульованого лікарського засобу із застосуванням системи для фільтрації з перехресним потоком.

(6) Регуляція концентрації

Для дисперсії ліпосом після видалення неінкапсульованих лікарських засобів визначали кількість гідрохлориду іринотекану із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії і регулювали до концентрації гідрохлориду іринотекану 5,0мг/мл.

(7) Стерилізація фільтруванням

Після регулювання концентрації дисперсію ліпосом фільтрували у циліндричну пробірку за допомогою стерилізувального фільтра з розміром пор 0,2мкм.

Склади і розміри частинок складів з CPT-11, одержаних вище, показані у таблиці 9.

Таблиця 9

	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кількість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	PEG-DSPE	Фосфоліпід	Загальний ліпід	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загального ліпиду	нм
	HSPC:Chol		мг/мл	моль/л			
Приклад одержання 11	54:46	0,75	20	47	4,92	0,16	97,2

(Тестовий приклад 6) Протипухлинний ефект

Клітини раку передміхурової залози людини (PC-3), $2,5 \times 10^6$ клітин/миша, імплантували підшкірно у ліву пахову ділянку миші (BALB/c голої, самця, вік 6 тижнів, Charles River Japan, Inc.). Після імплантації пухлин, передбачуваний об'єм пухлини обчислювали за допомогою $12 \cdot ab^2$ (а являє собою її поздовжній діаметр, і b являє собою діаметр по короткій осі). На наступну добу після доби (доба

0), в якій досягали передбачуваного об'єму пухлини приблизно 40 мм^3 , 3 рази на кожну четверту добу (доба 1, 5 і 9), у хвостову вену миші ін'єктували препарат CPT-11, одержаний у прикладі одержання 11, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині. Як контрольна група були присутні миші без ін'єкції будь-яких засобів.

Передбачуваний об'єм пухлини і масу тіла миші вимірювали на добу 1, 5, 9, 12, 16 і 22.

Після вирізування пухлин і вимірювання їхньої маси на добу 22, далі обчислювали ступінь інгібування росту пухлини LR. (%) за наступною формулою.

$LR. \% = (1 - \frac{\text{середня маса пухлини у групі лікування}}{\text{середня маса пухлини у контрольній групі}}) \times 100$

Результати показані у таблиці 10 і на Фіг.6 і 7.

Як для препарату CPT-11, так і для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині

показали значний приглушувальний ефект на ріст пухлини для раку передміхурової залози людини у групі лікування порівняно з контрольною групою. Для препарату CPT-11 показали більш високий протипухлинний ефект, ніж для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (таблиця 10, Фіг.6). Крім того, жоден із засобів не впливав на масу тіла миші (Фіг.7).

Таблиця 10

	Доза (мг/кг)	Маса пухлини (г, середнє ± S.D.)	Ступінь інгібування (%)
Контрольна група	-	1,26±0,18	-
Препарат CPT-11 (Приклад одержання 11)	25	0,03±0,01	97,9
	50	0,02±0,00	98,3
	100	0,01±0,00	99,0
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	25	0,64±0,25	49,0
	50	0,66±0,13	48,0
	100	0,48±0,20	62,3

(Тестовий приклад 7) Фармакокінетика

Препарат CPT-11, одержаний у прикладі одержання 11, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині безперервно ін'єктували у головну вену яванського макака (самець, вік від 4 до 5 років, Guangxi Research Center of Primate Laboratory Animal) протягом 4хв. до досягнення вмісту гідрохлориду іринотекану 10мг/кг.

Збирали кров яванського макака відразу після ін'єкції і після початку ін'єкції; після 10 і 30хв.; і після 1, 6, 24, 48, 72, 168, 336 і 504 годин; плазму крові одержували поділом центрифугуванням. Додаванням до 50мкл плазми крові 550мкл розчину внутрішнього стандарту В (розчину речовин внутрішнього стандарту у метанолі) і застосуванням відцентрової сили, супернатант розводили у метанолі у 100 разів як зразок для вимірювання загальної концентрації CPT-11. Тим часом, додаючи до 50мкл плазми крові 200мкл розчину внутрішнього стандарту А (0,147моль/л розчину речовин внутрішнього стандарту у H_3PO_4), 200мкл з цього піддавали поділу центрифугуванням (100000×g, протягом 30хв., 10°C). 100мкл із верхнього водного шару відокремлювали і піддавали твердофазовій екстракції для одержання елюенту як зразки для вимірювання концентрації вільного CPT-11 (тобто CPT-11, вивільненого з ліпосоми, який далі позначається «вивільнений з ліпосоми CPT-11»), вимірювання концентрації SN-38 і вимірювання концентрації SN-38G (SN-38 10-О-глюконіду). В одержаних зразках вимірювали концентрацію кожного з них LC/MS/MS. Результати показані на Фіг.8-11.

У розчині гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині загальна концентрація CPT-11 після ін'єкції швидко зменшувалася до меншої, ніж нижня межа кількісного визначення (<1мкг/мл), до 1 години. При цьому для препарату CPT-11 загальна концентрація CPT-11 зменшувалася експоненціально від 1 до 48 годин після ін'єкції, і виявили значне продовження часу утримування порівняно з розчином гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (Фіг.8).

Для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація вільного CPT-11 зменшувалася відносно швидко до 6 годин після досягнення найвищої концентрації відразу після ін'єкції, після чого концентрація зменшувалася помірно. При цьому для препарату CPT-11 концентрація вільного CPT-11 досягала найвищої концентрації за 1 годину після ін'єкції, і потім зменшувалася помірно (Фіг.9).

Для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація SN-38 швидко зменшувалася після досягнення найвищої концентрації відразу після ін'єкції і зменшувалася до меншої, ніж нижня межа кількісного визначення (<0,0005мкг/мл), до 24 годин. При цьому для препарату CPT-11 концентрація SN-38 зберігалася протягом 1 години після досягнення найвищої концентрації відразу після ін'єкції. Після цього концентрація зменшувалася, щоб підтримуватися від 6 до 48 годин (Фіг.10).

Як для препарату CPT-11, так і для розчину гідрохлориду іринотекану, концентрація SN-38G збільшувалася 1 годину після ін'єкції, щоб слабо знижуватися з підтриманням концентрації (Фіг.11).

(Тестовий приклад 8) Гемотоксичність

Препарат CPT-11, одержаний у прикладі одержання 11, ін'єктували у хвостову вену щура (CD(SD)IGS, самця, у віці 7 тижнів, Charles River Japan, Inc.) до досягнення вмісту гідрохлориду іринотекану 3, 10 і 30мг/кг, або до досягнення вмісту розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині 30мг/кг.

Збирали по 0,4мл крові із шийної вени щура до і після ін'єкції; і після 2, 4, 6, 13, 20 і 27 доби (протягом 4 тижнів); кількість нейтрофілів і лімфоцитів вимірювали автоматичним гематологічним аналізатором (Sysmex XT-2000I, Sysmex). Результати показані на Фіг.12 і 13.

Кількість нейтрофілів короткочасно зменшувалася, після цього швидко відновлюючись після будь-якої кількості, яка ін'єктується. При дозі 10 і 30мг/кг порівняно із вмістом гідрохлориду іринотекану 3мг/кг, ступінь скорочення кількості був великим. При дозі 30мг/кг кількість збільшилася швидко

у період відновлення. При 30мг/кг кожного із двох засобів, які ін'єктуються, не виявили значних відмінностей між змінами кількості нейтрофілів (Фіг.12). Кількість лімфоцитів знижувалася негайно після ін'єкції, хоча і тільки слабо. Проте, не було різниці між ін'єкціями (Фіг.13).

Описані вище результати показали тимчасову слабку гемотоксичність для нейтрофілів препарату СРТ-11. Однак інтенсивність гемотоксичності приблизно дорівнювала гемотоксичності такої ж кількості розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині.

[Приклад 9]

(Приклад одержання 12)

(1) Одержання ліпосоми

Зважували 65,250г HSPC, 26,800г Chol і 8,000г TRX-20, і додавали до них 100мл абсолютного спирту. Потім їх розчиняли з нагріванням при 68°C. Після підтвердження, що вони розчинилися повністю, до них додавали 900мл розчину сульфату амонію (250мМ), і суміш перемішували з нагріванням при 68°C.

(2) Регуляція розміру частинок ліпосоми

Регуляція розміру частинок ліпосоми: після завершення перемішування з нагріванням одержану суміш пропускали через фільтр із розміром пор 100нм п'ять разів із застосуванням екструдера, нагрітого до 68°C.

Введення PEG5000-DSPE: після екструзії до зразка додавали 200мл розчину PEG₅₀₀₀-DSPE (36,74мг/мл) так, щоб одержати визначений вміст PEG₅₀₀₀-DSPE (%мол.), і перемішували суміш при 60°C протягом 30 хвилин, щоб таким чином ввести PEG₅₀₀₀-DSPH Після введення зразок охолоджували на льоді.

(3) Заміна зовнішньої водної фази

Для льодяного зразка проводили заміну зовнішньої водної фази із застосуванням системи для фільтрації з перехресним потоком на розчин зовнішньої водної фази (10мМ гістидин/10% сахаро-

за) (рН6,5). Після заміни зовнішньої водної фази концентрацію HSPC і концентрацію холестерину визначали високоефективною рідинною хроматографією. Кількість гідрохлориду іринотекану, який підлягає інкапсуляції, обчислювали по підсумовуванню концентрації HSPC і концентрації холестерину як концентрації загального ліпиду.

(4) Інкапсуляція лікарського засобу

Одержували розчин гідрохлориду іринотекану (СРТ-11) у RO-воді (вода, очищена на мембрані зворотним осмосом) з концентрацією 10мг/мл. До дисперсії ліпосом додавали розчин гідрохлориду іринотекану у кількості СРТ-11/кількість загальних ліпідів = 0,16 (мол./мол.) у відношенні до кількості загальних ліпідів (мМ) вказаної вище, і суміш перемішували при 50°C протягом 20 хвилин, щоб таким чином ввести гідрохлорид іринотекану. Після введення зразок охолоджували на льоді.

(5) Видалення неінкапсульованого лікарського засобу

Після інкапсуляції гідрохлориду іринотекану до дисперсії ліпосом додавали розчин зовнішньої водної фази і проводили видалення неінкапсульованого лікарського засобу із застосуванням системи для фільтрації з перехресним потоком.

(6) Регуляція концентрації

Для дисперсії ліпосом після видалення неінкапсульованих лікарських засобів визначали кількість гідрохлориду іринотекану із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії і регулювали до концентрації гідрохлориду іринотекану 5,0мг/мл.

(7) Стерилізація фільтруванням

Після регулювання концентрації дисперсію ліпосом фільтрували у циліндричну пробірку за допомогою стерилізувального фільтра з розміром пор 0,2мкм.

Склади і розміри частинок складів з СРТ-11, одержаних вище, показані у таблиці 11.

Таблиця 11

	Початковий склад мембрани (молярне співвідношення)		Концентрація ліпиду		Концентрація лікарського засобу	Підтримувана кіль- кість лікарського засобу	Розмір частинок
	Ліпід	PEG-DSPE	Фосфоліпід	Загальний ліпід	мг/мл	Моль лікарського засобу/моль загал- ьного ліпиду	нм
			мг/мл	мМ			
Приклад одержання 12	50:42:8	0,75	18	44	4,66	0,15	92,0

(Тестовий приклад 9) Протипухлинний ефект

Клітини раку ободової кишки людини (HCT116), 2×10^6 клітин/миша, імплантували підшкірно у ліву пахову ділянку миші (BALB/c голої, самця, вік 6 тижнів, Charles River Japan, Inc.). Після імплантації пухлин обчислювали передбачуваний об'єм пухлини за допомогою $1/2 \cdot ab^2$ (а являє собою по-здовжній діаметр пухлини, і b являє собою її діаметр по короткій осі), який досягає приблизно 90мм³ за добу (доба 0). З наступної доби 3 рази на кожну четверту добу (доба 1, 5 і 9), препарат СРТ-11, одержаний у прикладі одержання 12, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині ін'єктували у хвостову вену миші. Як конт-

рольна група були присутні миші без ін'єкції будь-яких засобів.

Передбачуваний об'єм пухлини і масу тіла миші вимірювали на добу 5, 8, 12, 16 і 21 після ін'єкції. Після вирізування пухлин і вимірювання їхньої маси на добу 21 після ін'єкції, далі обчислювали ступінь інгібування росту пухлини I.R.(%) за формулою, як показано у тестовому прикладі 6.

Результати показані у таблиці 12 і на Фіг.14 і 15.

Для кожного із препарату і розчину гідрохлориду іринотекану СРТ-11 у фізіологічному розчині показали значний приглушувальний ефект на ріст пухлини для раку ободової кишки людини у групи

лікування порівняно з контрольною групою. Препарат CPT-11 надавав більш високий протипухлинний ефект, ніж розчин гідрохлориду іринотека-

ну у фізіологічному розчині (таблиця 12, Фіг.14). Крім того, жодний із засобів не впливав на масу тіла миші (Фіг.15).

Таблиця 12

	Доза (мг/кг)	Маса пухлини (г, середнє± S.D.)	Ступінь інгібування (%)
Контрольна група	-	1,25±0,15	-
Препарат CPT-11 (Приклад одержання 12)	18,75	0,61±0,11	51,1
	37,5	0,36±0,07	70,8
	75	0,14±0,03	88,7
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	18,75	0,76±0,06	39,0
	37,5	0,71±0,08	43,4
	75	0,53±0,14	57,4

(Тестовий приклад 10) Фармакокінетика у результаті одноразового введення Після введення катетерів у стегнову вену щура (CD(SD)IGS щур, самець, вік 7 тижнів Charles River Japan, Inc.) при анестезії і поміщення щура у камеру Больмана, препарат CPT-11, одержаний у прикладі одержання 12, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині ін'єктували щурові внутрішньовенно через катетер у стегновій вені до досягнення вмісту гідрохлориду іринотекану 3, 10 і 30мг/кг.

Збирали кров щура після ін'єкції; після 2, 10 і 30хв.; і після 1, 3, 6, 9, 24 і 30 годин; поділом центрифугуванням одержували 50мкл плазми крові, щоб розвести 200мкл розчину внутрішнього стандарту. Після додавання до 50мкл плазми крові, розведеної розчином внутрішнього стандарту, 500мкл метанолу і перемішування, розведену плазму крові розводили у 10 разів 0,146М H₃PO₄ як зразок для вимірювання загальної концентрації CPT-11. При цьому, піддаючи 200мкл розведеної плазми крові поділу центрифугуванням (100000 x g, протягом 30 хв., 10°C), одержані 50мкл у верхньому шарі, розводили 0,146М H₃PO₄ у 10 разів як зразок для вимірювання концентрації вільного CPT-11, вимірювання концентрації SN-38 і вимірювання концентрації SN-38G. В одержаних зразках вимірювали концентрацію кожного з них ПРОСПЕКТ-HPLC відповідно до таких способів, як спосіб Kurita [J. Chromatogr. B 724, p 335 to 344, 1999]. Результати показані на Фіг.16-19.

У розчині гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині загальна концентрація CPT-11 після ін'єкції швидко зменшувалася, і зменшувалася експоненціально від 0,5 до 9 годин для будь-якої кількості, яка ін'єктується (3, 10 і 30мг/кг). При цьому для препарату CPT-11 загальна концентрація CPT-11 зменшувалася майже експоненціально від 10 хв. до 30 годин після ін'єкції, виявили значне продовження часу утримання порівняно з розчином гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (Фіг.16).

Концентрація вивільненого з ліпосоми CPT-11 зменшувалася майже експоненціально від 10 хв. до 30 годин після ін'єкції препарату CPT-11, і виявили значне продовження часу утримання порівняно з розчином гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (Фіг.17).

У розчині гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація SN-38 швидко зменшувалася відразу після ін'єкції і помірно зменшу-

валася через 1 годину для будь-якої кількості, яка ін'єктується, зберігаючись протягом 3 годин приблизно 30мг/кг. При цьому для препарату CPT-11 концентрація SN-38 зменшувалася помірно після досягнення найвищої концентрації від 3 до 6 годин після ін'єкції при дозах 3 і 10мг/кг, відповідно. Концентрація швидко зменшувалася протягом 1 години після досягнення найвищої концентрації відразу після ін'єкції, щоб майже зберігатися 9 годин для дози 30мг/кг (Фіг.18).

У розчині гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація SN-38G швидко зменшувалася 1 годину після досягнення найвищої концентрації через 10хв. після ін'єкції будь-якої кількості, яка ін'єктується, щоб після цього зменшуватися помірно. При цьому для препарату концентрація CPT-11 SN-38G збільшувалася до 1 години після ін'єкції, щоб повільно зменшуватися з підтриманням концентрації (Фіг.19).

[Приклад 10]

Тестували склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 9, як склад, який добре підтримує CPT-11, за даним винаходом.

(Тестовий приклад 11) Протипухлинний ефект

Клітини раку ободової кишки людини (HT-29) квадратом 2-3мм трансплантували підшкірно у пахову ділянку миші (BALB/c голої, самця, вік 6 тижнів, CLEA Japan, Inc.) голкою для трансплантації. Склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 9, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині ін'єктували у хвостову вену всього три рази, які являли собою точку (доба 1), в якій приблизний об'єм пухлини обчислювали за допомогою $1/2 \cdot ab^2$ (a стосується більшої осі кожної пухлини, b стосується меншої осі), який наближається до приблизно 100мм³, додаткові 4 доби (доба 5), і додаткові 8 діб (доба 9), після трансплантації пухлин. Миші без ін'єкції будь-яких засобів служили контрольною групою.

Приблизний об'єм пухлин і масу тіла миші обчислювали на добу 4, 8, 12, 17, 21 після першої ін'єкції. Пухлини вирізували також на 21 добу після ін'єкції, і вимірювали масу пухлин, щоб таким чином обчислити ступінь інгібування проліферації пухлини, I.R. (%) за формулою, як показано у тестовому прикладі 6.

Результати показані у таблиці 13, на Фіг.20 і Фіг.21.

Як для препарату CPT-11, так і для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині показали значний приглушувальний ефект на про-

ліферацію пухлини для раку ободової кишки людини у групі лікування порівняно з контрольною групою. Далі склад з CPT-11 проявляв більш високий протипухлинний ефект порівняно з розчином

гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (таблиця 13, Фіг.20). Крім того, жодний із засобів не впливав на масу тіла миші (Фіг.21).

Таблиця 13

	Доза (мг/кг)	Маса пухлини (г, середнє ± S.D.)	Ступінь інгібування (%)
Контрольна група	-	0,58±0,29	-
Препарат CPT-11 (Приклад одержання 9)	25	0,18±0,15	69,4
	50	0,09±0,06	84,1
	100	0,05±0,03	92,0
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	25	0,36±0,41	38,2
	50	0,44±0,36	24,9
	100	0,33±0,32	44,0

(Тестовий приклад 12) Фармакокінетика у результаті одноразового введення Фібросаркому миші (Meth A), $2,5 \times 10^5$ клітин/миша, трансплантували підшкірно у пахову ділянку миші (BALB/c, самка, вік 7 тижнів, Japan SLC, Inc.). Пухлині дозволяли рости протягом 20 днів після трансплантації пухлин, і потім склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 9, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині вводили у хвостову вену з концентрацією гідрохлориду іринотекану 10мг/кг.

Після введення кров у серці відбирали через 10 і 30 хвилин, і 1, 3, 6, 12, 24, 48 і 96 годин, центрифугували (15000об./хв., 1 хвилина, 0°C), щоб таким чином одержати плазму. Одержану плазму розводили у 50 разів 0,146М H_3PO_4 , і додавали рівний об'єм розчину внутрішнього стандарту як зразок для вимірювання концентрації CPT-11 у плазмі тварини, якій вводили склад з CPT-11. Одержану плазму розводили у 4 рази 0,146М H_3PO_4 , і додавали рівний об'єм розчину внутрішнього стандарту як зразок для вимірювання як концентрації SN-38, так і концентрації SN-38G у плазмі тварини, якій вводили склад з CPT-11, і концентрації лікарського засобу у плазмі тварини, якій вводили розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині.

Після відбору крові у серці пухлини вирізували з пахової ділянки, промивали фізіологічним розчином і вимірювали масу пухлини. До одержаної пухлини додавали у 5 разів більшу кількість охолодженої 0,146М H_3PO_4 , і гомогенізували у тефлоновому гомогенізаторі. 200мкл одержаної гомогенізованої пухлини додавали до 50мкл розчину внутрішнього стандарту і 0,75мл метанолу, суспендували і потім залишали стояти протягом ночі при -20°C. Одержаний розчин центрифугували (15000об./хв., 3 хвилини, 0°C) перед додаванням 0,4мл 0,146М H_3PO_4 до 0,1мл супернатанта, щоб таким чином одержати зразок для вимірювання HPLC. Кожну концентрацію в одержаному зразку для вимірювання вимірювали PROSPEKT-HPLC відповідно до способу Kurita [J. Chromatogr B 724, pp.335-344, 1999], або подібного. Результати показані на Фіг.22-27.

Для складу з CPT-11 для концентрації CPT-11 у плазмі збільшувалася площа під кривою концентрація у плазмі - час аж до 302 разів, і середній час знаходження (присутності) аж до 4,4 разів порівняно з розчином гідрохлориду іринотекану у

фізіологічному розчині, відповідно, завдяки ліпосомному складу (Фіг.22). При цьому одержання у вигляді ліпосомного складу збільшувало площу під кривою концентрація у плазмі - час аж до 2,5 разів, так само як концентрацію SN-38 у плазмі, і продовжувало середній час знаходження у плазмі (Фіг.23). Крім того, одержання у вигляді ліпосомного складу збільшувало площу під кривою концентрація у плазмі - час аж до 1,8, так само як концентрацію SN-38G у плазмі, і продовжувало середній час знаходження (Фіг.24).

Для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація гідрохлориду іринотекану у пухлинних тканинах досягала максимального рівня концентрації у пухлинній тканині через 0,5 години після введення, і потім зменшувалася при півжитті 2,3 години. Тимчасом для складу з CPT-11 концентрація збільшувалася поступово і досягала максимального рівня концентрації у пухлинній тканині через 12 годин, і потім зменшувалася більш помірно, ніж для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині зі збільшенням площі під кривою концентрація у пухлинній тканині - час у 9,0 разів (Фіг.25).

Для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація SN-38 у пухлинних тканинах досягала максимальної концентрації у пухлинній тканині за 10 хвилин після введення, і потім зменшувалася поступово. Для складу з CPT-11 концентрація поступово збільшувалася за 6 годин після введення, і потім підтримувалася постійною приблизно 48 годин. Потім концентрація зменшувалася при ослабленні до півжиття майже таким же чином, як концентрація розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині, зі збільшенням площі під кривою концентрація у пухлинній тканині - час у 3,9 разів (Фіг.26).

Для розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині концентрація SN-38G у пухлинних тканинах досягала максимальної концентрації у пухлинній тканині за 10 хвилин після введення, і потім зменшувалася поступово. Для складу з CPT-11 концентрація поступово збільшувалася, досягала максимальної концентрації у пухлинній тканині за 12 годин після введення, і потім зменшувалася поступово (Фіг.27).

Отже, підтвердили, що здатність до утримання у крові і властивості проходження пухлини у складу з CPT-11 були вищі, ніж у розчині гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині.

[Приклад 11]

Склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 7, тестували як склад, який добре підтримує CPT-11, за даним винаходом.

(Тестовий приклад 13) Протипухлинний ефект у результаті триразового введення лікарського засобу

Фібросаркому миші (Meth A), $2,5 \times 10^5$ клітин/миша, трансплантували підшкірно у пахову ділянку миші (BALB/c, самка, вік 7 тижнів, CLEA Japan, Inc.). Склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 7, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині вводили у хвостову вену всього три рази, тобто на 7, 9 і 11 добу або на 7, 11 і 15 добу після трансплантації

пухлин. Миші без ін'єкції будь-яких засобів служили контрольною групою.

Пухлини вирізували також через 21 добу після трансплантації і вимірювали масу пухлин, щоб таким чином обчислити ступінь інгібування проліферації пухлини, LR. (%) за формулою, як показано у тестовому прикладі 6. Результати показані у таблиці 14.

Кожний із препарату CPT-11 і розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині демонстрував значний приглушувальний ефект на проліферацію пухлини для фібросаркоми миші порівняно з контрольною групою. Далі склад з CPT-11 проявляв більш високий протипухлинний ефект, ніж розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині. Крім того, жодний із засобів не впливав на масу тіла миші.

Таблиця 14

	Доза (мг/кг)	Лікування на добу	Маса пухлини (г, серед- не \pm S.D.)	Ступінь інгібування (%)
Контрольна група	-	-	2,01 \pm 0,30	-
Склад з CPT-U (Приклад одержання 7)	50	7,9,11	0,20 \pm 0,17	89,9
	100	7,9,11	0,08 \pm 0,01	96,2
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	50	7,9,11	1,47 \pm 0,18	26,9
	100	7,9,11	0,28 \pm 0,42	86,0
Склад з CPT-11 (Приклад одержання 7)	50	7,11,15	0,81 \pm 0,47	59,6
	100	7,11,15	0,16 \pm 0,12	92,3
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	50	7,11,15	1,99 \pm 0,47	1,0
	100	7, 11,15	1,26 \pm 0,49	37,4

(Тестовий приклад 14) Протипухлинний ефект у результаті одноразового або дворазового введення лікарського засобу

Фібросаркому миші (Meth A), $2,5 \times 10^5$ клітин/миша, трансплантували підшкірно у пахову ділянку миші (BALB/c, самка, вік 7 тижнів, CLEA Japan, Inc.). Склад з CPT-11, одержаний у прикладі одержання 7, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині вводили у хвостову вену на 7 і/або 11 добу всього один раз або двічі після трансплантації пухлин. Миші без ін'єкції будь-яких засобів служили контрольною групою.

Пухлини вирізували також через 21 добу після трансплантації і вимірювали масу пухлин, щоб таким чином обчислити ступінь інгібування пролі-

ферації пухлини, LR. (%) за формулою, як показано у тестовому прикладі 6. Результати показані у таблиці 15.

Кожний зі складів з CPT-11 і розчинів гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині демонстрував значний приглушувальний ефект на проліферацію пухлини для фібросаркоми миші порівняно з контрольною групою, за винятком частини розчинів гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині. Крім того, деякі зі складів з CPT-11 проявляли більш високий протипухлинний ефект, ніж розчини гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині. Крім того, жоден із двох видів засобів не впливав на масу тіла миші.

Таблиця 15

	Доза (мг/кг)	Лікування на добу	Маса пухлини (г, серед- не \pm S.D.)	Ступінь інгібування (%)
Контрольна група	-	-	3,53 \pm 0,25	-
Склад з CPT-H (Приклад одержання 7)	12,5	7	1,95 \pm 0,29	44,7
	25	7	1,77 \pm 0,61	49,8
	50	7	1,06 \pm 0,38	70,1
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	12,5	7	2,82 \pm 0,51	20,2
	25	7	2,61 \pm 0,40	26,0
	50	7	2,34 \pm 0,17	33,7
Склад з CPT-11 (Приклад одержання 7)	25	11	1,70 \pm 0,81	51,8
	50	11	1,41 \pm 0,42	60,2
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	25	11	2,40 \pm 0,74	32,1
	50	11	1,98 \pm 0,45	44,0
Склад з CPT-11 (Приклад одержання 7)	12,5	7,11	1,95 \pm 0,19	44,8
	25	7,11	1,63 \pm 0,39	54,0
	50	7,11	0,65 \pm 0,13	81,6

Продовження таблиці 15

Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	12,5	7,11	2,49±0,29	29,4
	25	7,11	2,33±0,62	34,1
	50	7,11	2,08±0,43	41,2

[Приклад 12]

Склад з СРТ-11, одержаний у прикладі одержання 8, тестували як склад, який добре підтримує СРТ-11, за даним винаходом.

(Тестовий приклад 15) Протипухлинний ефект

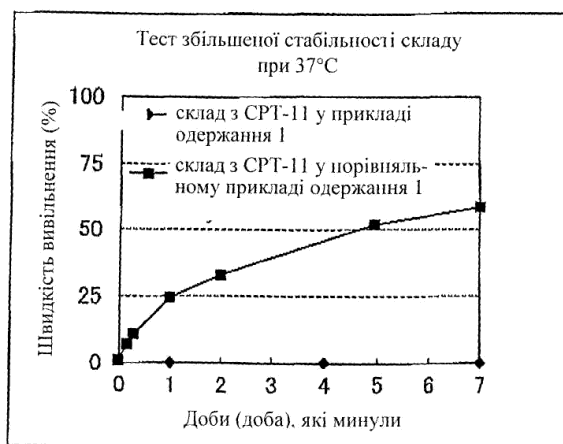
Клітини раку легені людини (QG56) квадратом 2-3мм трансплантували підшкірно у пахову ділянку миші (BALB/c гола, самець, вік 6 тижнів, CLEA Japan, Inc.) голкою для трансплантації. Склад з СРТ-11, одержаний у прикладі одержання 8, або розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині ін'єктували у хвостову вену всього три рази, які являли собою точку (доба 1), в якій приблизний об'єм пухлини розраховували за допомогою $1/2 \cdot ab^2$ (а стосується більшої осі пухлини, b стосується меншої осі), який наближається до близько 1мм, додаткові 4 доби (доба 5), і додаткові 8 днів (доба 9) після трансплантації пухлин. Миші без ін'єкції будь-якого засобу служили контрольною групою.

Приблизний об'єм кожної пухлини і масу тіла миші обчислювали на добу 4, 8, 12, 16 і 21 після першої ін'єкції. Пухлини вирізували також на 21 добу після першої ін'єкції, і вимірювали масу пухлин, щоб таким чином обчислити ступінь інгібування проліферації пухлини, LR. (%) за формулою, як показано у тестовому прикладі 6. Результати показані у таблиці 16, на Фіг.28 і Фіг.29.

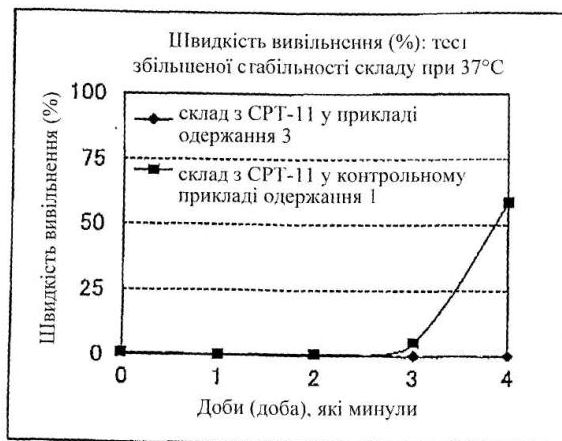
Кожний зі складу з СРТ-11 і розчину гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині демонстрував значний приглушувальний ефект на проліферацію пухлини для легеневої карциноми людини порівняно з контрольною групою. Далі склад з СРТ-11 проявляв більш високий протипухлинний ефект порівняно з розчином гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині (таблиця 16, Фіг.28). Крім того, жодний із засобів не впливав на масу тіла миші (Фіг.29).

Таблиця 16

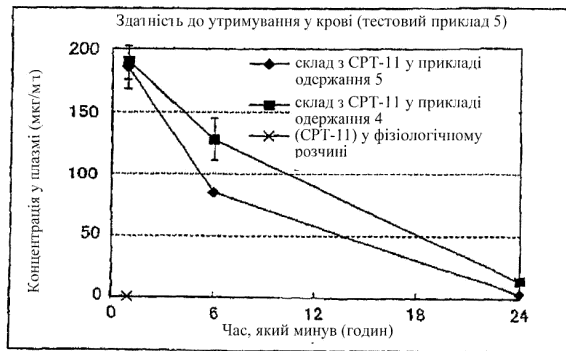
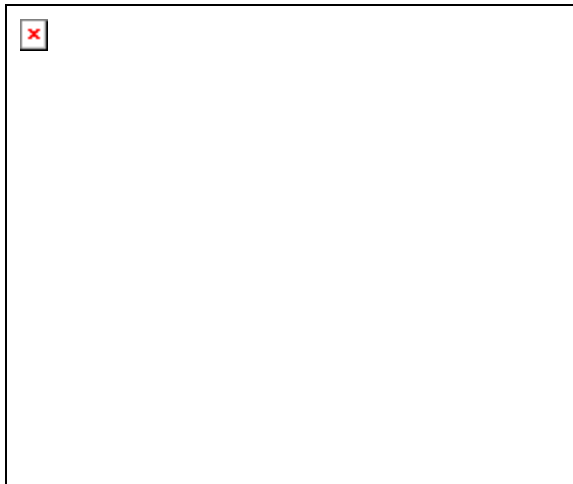
	Доза (мг/кг)	Маса пухлини (г, середнє ± S.D.)	Ступінь інгібування (%)
Контрольна група	-	2,91±0,21	-
Склад з СРТ-11 (Приклад одержання 8)	25	0,03±0,02	99,0
	50	0,02±0,00	99,3
	100	0,03±0,02	99,2
Розчин гідрохлориду іринотекану у фізіологічному розчині	25	1,88±0,43	35,5
	50	1,49±0,51	48,7
	100	0,95±0,18	67,2



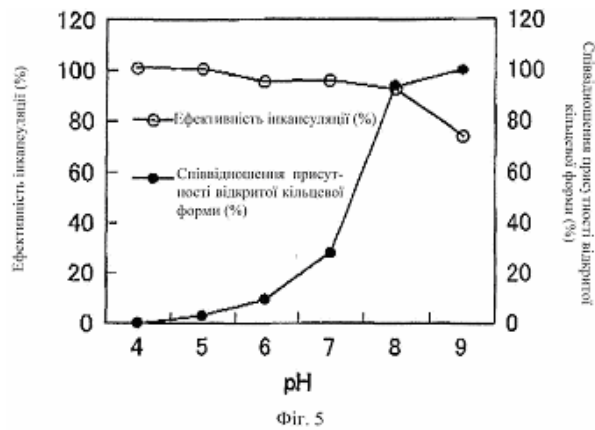
Фіг. 1



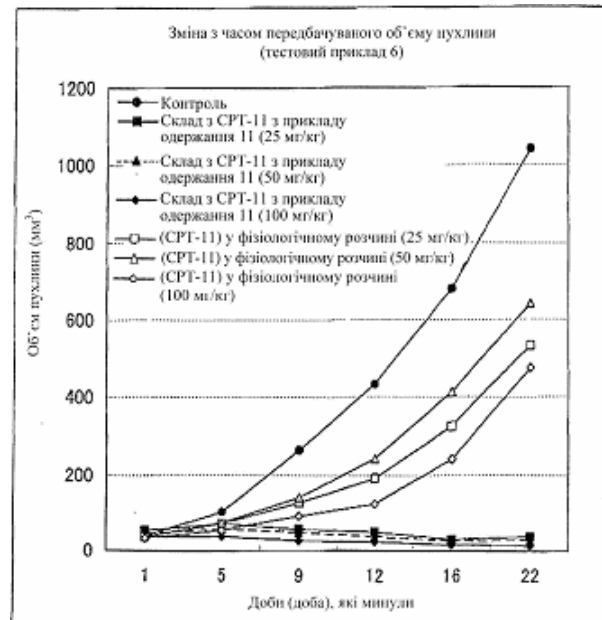
Фіг. 2



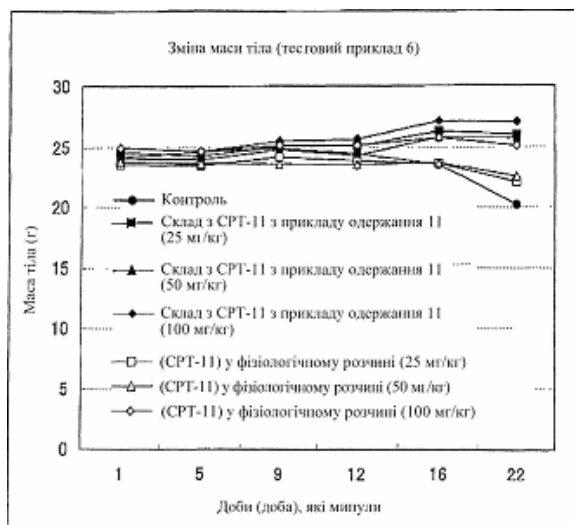
Фіг. 4



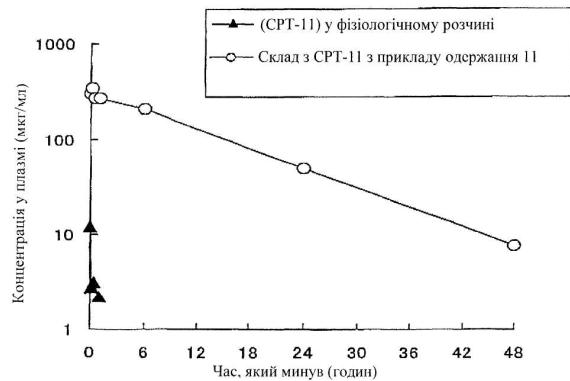
Фіг. 5



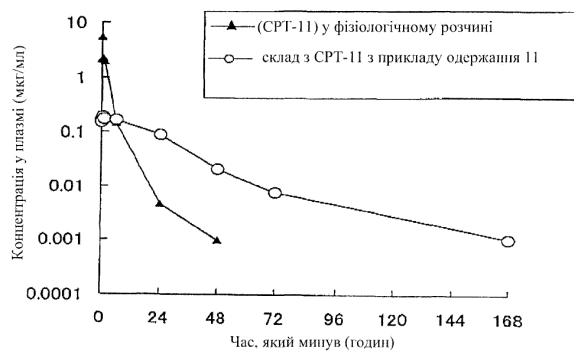
Фіг. 6



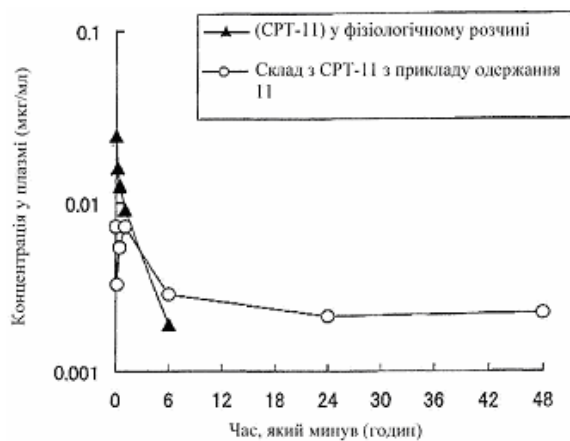
Фіг. 7



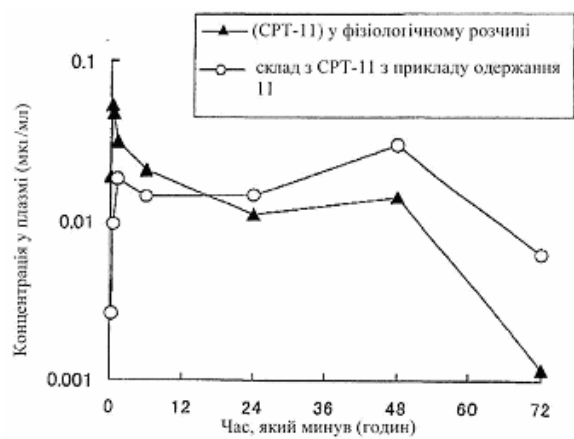
Фіг. 8



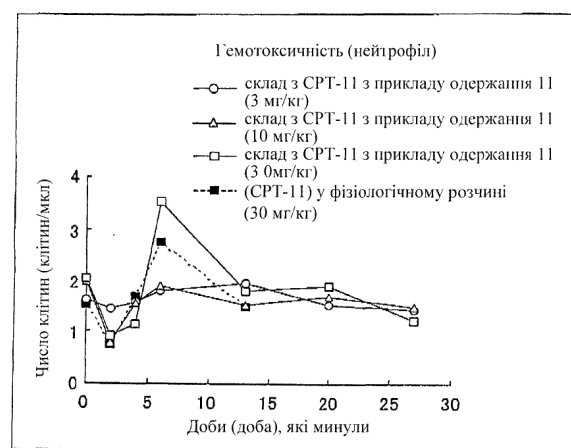
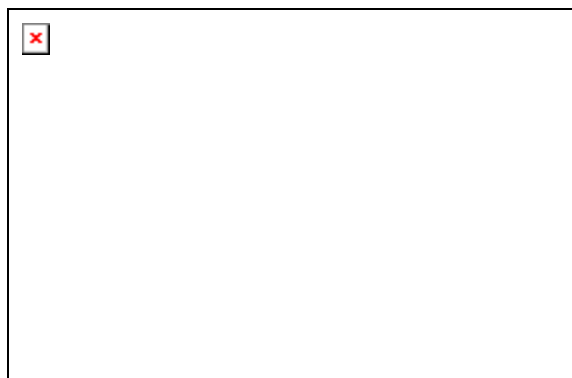
Фіг. 9



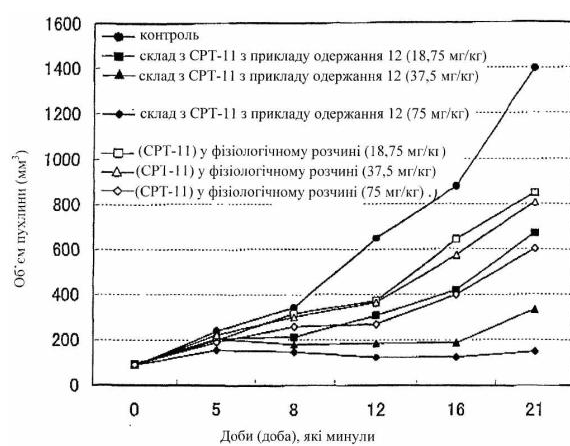
Фіг. 10



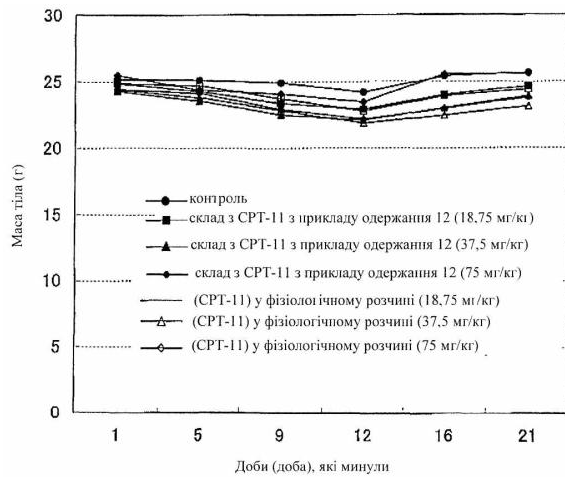
Фіг. 11



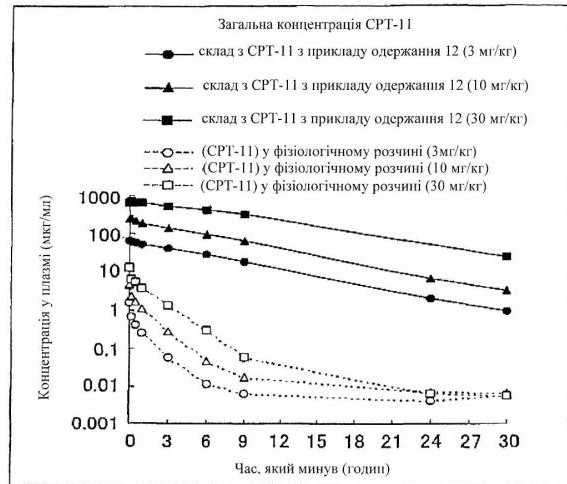
Фіг. 13



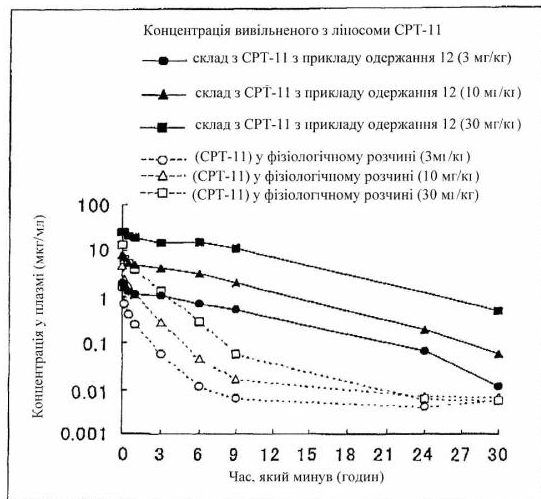
Фіг. 14



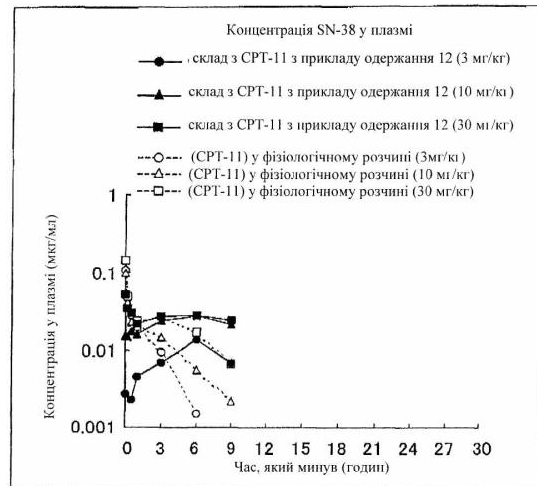
Фіг. 15



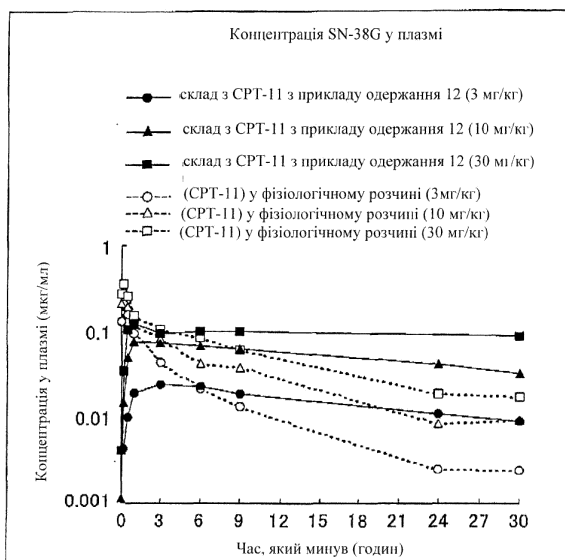
Фіг. 16



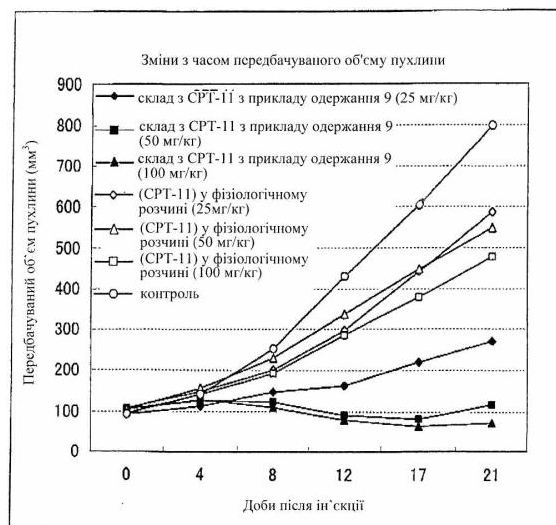
Фіг. 17



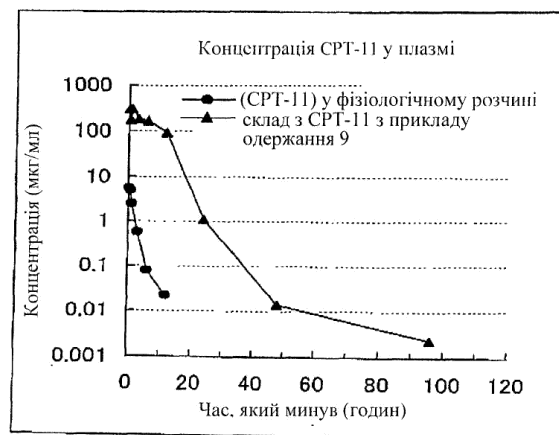
Фіг. 18



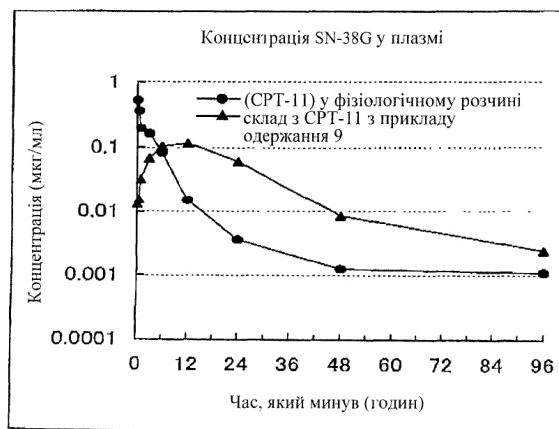
Фіг. 19



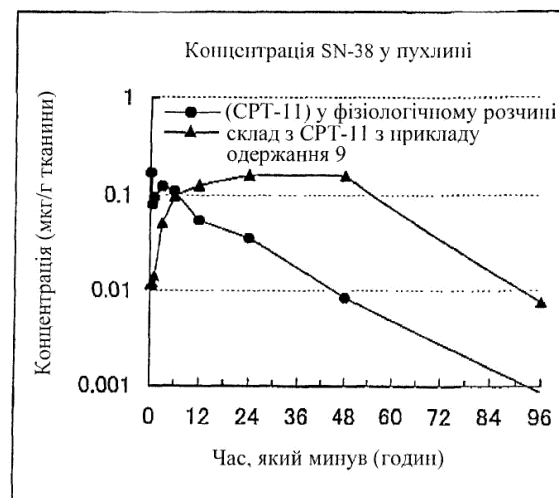
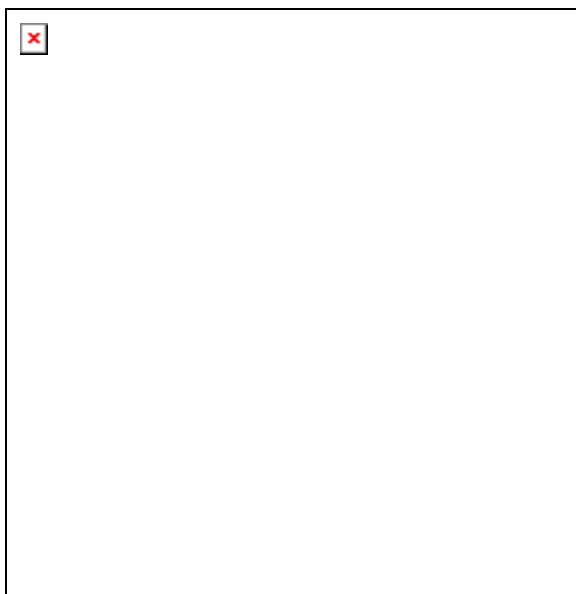
Фіг. 20



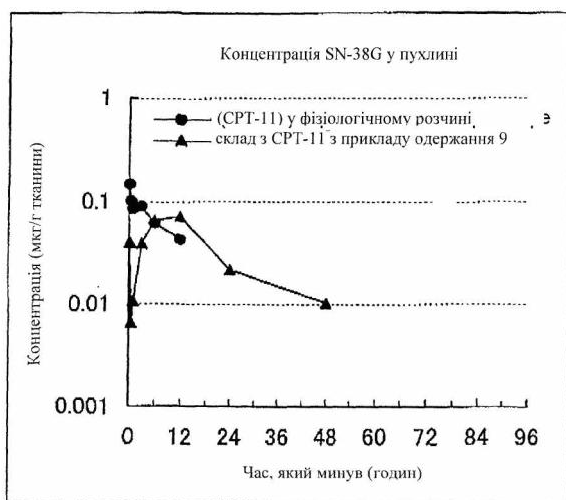
Фіг. 22



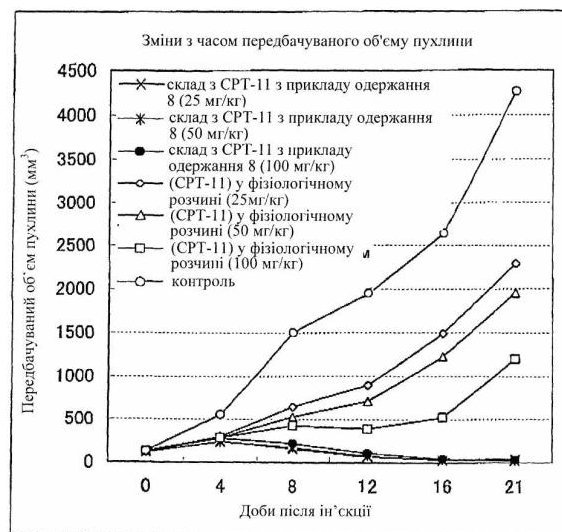
Фіг. 24



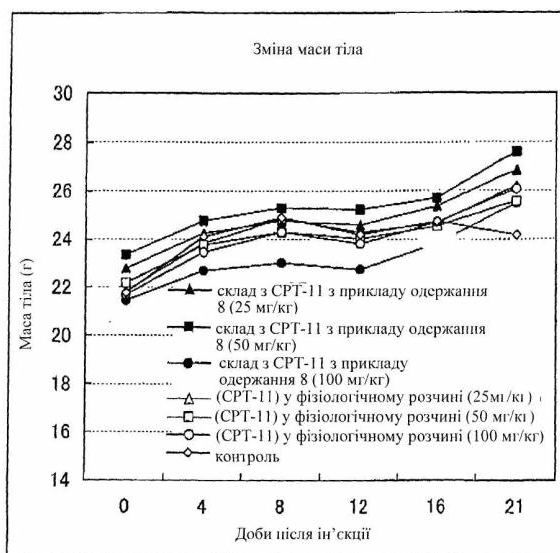
Фіг. 26



Фіг. 27



Фіг. 28



Фіг. 29