

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090476 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.29(51) Int. Cl. A61L 27/50 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.08.21

(54) ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ СОСТАВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СМАЗЫВАЮЩЕЙ СРЕДЫ СУСТАВА

(31) 62/548,429

(72) Изобретатель:

(32) 2017.08.22

Баренхольц Йехезкель, Долев Янив,
Турджеман Керен, Сарфати Гади, Аял-
Гершковиц Мати (IL)

(33) US

(86) PCT/IL2018/050923

(87) WO 2019/038763 2019.02.28

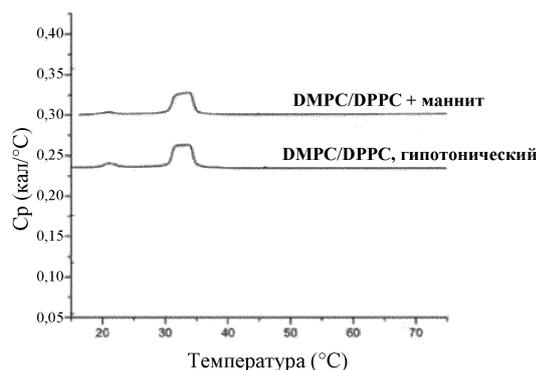
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нилова М.И. (RU)

МЁБИУС МЕДИКАЛ ЛТД. (IL)

(57) В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция для обеспечения смазывающей среды суставов, причем фармацевтическая композиция содержит неионогенное регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол, и липосомы, содержащие по меньшей мере одну мембрану, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C₁₂-C₁₈-углеводородные цепи, которые могут быть идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C₁₂-C₁₈-углеводородную цепь, причем фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20 до приблизительно 39°C, а сустав характеризуется температурой сустава, которая превышает температуру фазового перехода.



A1

202090476

202090476

A1

ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ СОСТАВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СМАЗЫВАЮЩЕЙ СРЕДЫ СУСТАВА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к липосомальным фармацевтическим композициям, в которых единственными активными фармацевтическими средствами являются фосфолипиды сами по себе, и их терапевтическому применению для обеспечения смазывающей среды сустава.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Дисфункции суставов поражают очень большую часть населения. Достаточное количество биологической смазывающей среды является необходимым условием для надлежащей подвижности сустава, что имеет решающее значение для предотвращения и устранения деструктивных изменений в суставе.

Распространенной дисфункцией суставов является остеоартрит (ОА), при этом распространенность заболевания превышает более 20 миллионов в одних только Соединенных Штатах Америки. Существующие принципы лечения сосредоточены на уменьшении чрезмерной нагрузки на суставы, физиотерапии и облегчении боли и воспаления, обычно посредством системного или внутрисуставного введения лекарственных средств.

Суставной хрящ образует гладкую, прочную, эластичную и гибкую поверхность, которая облегчает движение костей. Синовиальное пространство заполнено высоковязкой синовиальной жидкостью (SF), содержащей гиалуроновую кислоту (HA) и гликопротеин лубрицин. HA представляет собой полимер из D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина, который является крайне нестойким и разрушается при воспалительных процессах, которые имеют место при ОА (Nitzan, D.W., Kreiner, B. & Zeltser, R. TMJ lubrication system: its effect on the joint function, dysfunction, and treatment approach. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **25**, 437–444 (2004); Yui, N., Okano, T. & Sakurai, Y. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J. Control. Release* **22**, 105–116 (1992)). В состав лубрицина входит ~44% белков, ~45% углеводов и ~11% фосфолипидов (PL), из которых ~41% представляют собой фосфатидилхолины (PC), ~27% —

фосфатидилэтаноламины (PE) и ~32% — сфингомиелины. Такие PL называют «поверхностно-активными фосфолипидами» (SAPL).

Граничная смазывающая среда, в которой слои молекул смазывающего вещества разделяют противоположные поверхности, возникает при нагрузке на сочленовные суставы. В качестве граничных смазывающих веществ естественного происхождения для суставного хряща были предложены несколько различных веществ, в том числе НА и лубрицин. Pickard et al. и Schwartz and Hills продемонстрировали, что фосфолипиды, определяемые как поверхностно-активные фосфолипиды лубрицина, обеспечивают смазывающую среду сустава для суставного хряща (Pickard, J.E., Fisher, J., Ingham, E. & Egan, J. Investigation into the effects of proteins and lipids on the frictional properties of articular cartilage. *Biomaterials* **19**, 1807–1812 (1998); Schwarz, I.M. & Hills, B.A. Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *Br. J. Rheumatol.* **37**, 21–26 (1998)). Hills и коллеги продемонстрировали, что при ОА суставы характеризуются дефицитом SAPL, и что инъекция поверхностно-активного фосфолипида, представляющего собой 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), в суставы пациентов с ОА вызывала улучшение подвижности, которое продолжалось до 14 недель без существенных побочных эффектов (Vecchio, P., Thomas, R. & Hills, B.A. Surfactant treatment for osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 1020–1021 (1999); Gudimelta, O.A., Crawford, R. & Hills, B.A. Consolidation responses of delipidized cartilage. *Clin. Biomech.* **19**, 534–542 (2004)). В другом исследовании с использованием уникальной криогенной методики сохранения хряща Watanabe et al. наблюдали липидные глобулярные везикулы на поверхности здорового хряща, которые, как предполагается, играют главную роль в обеспечении смазывающей среды (Watanabe, M. et al. Ultrastructural study of upper surface layer in rat articular cartilage by «in vivo cryotechnique» combined with various treatments. *Med. Elect. Microsc.* **33**, 16–24 (2000)). Kawano et al. и Forsey et al. с использованием животных моделей показали, что применение высокомолекулярной НА (~2000 кДа) объединенной с DPPC, улучшало смазывающую способность последнего (Kawano, T. et al. Mechanical effects of the intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipid on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1923–1929 (2003); Forsey, R.W. et al. The effect of

hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials* **27**, 4581–4590 (2006)).

В патенте США 6800298 раскрыты композиции гидрогеля на основе декстрана, содержащие липиды, в частности фосфолипиды, для обеспечения смазывающей среды суставов млекопитающих.

Заявка на патент США 2005/0123593 направлена на композицию, содержащую гликозаминогликаны, инкапсулированные в липосомальную систему доставки для внутрисуставного введения при лечении остеоартрита.

Патент США 8895054 касается способов обеспечения смазывающей среды сустава и/или предотвращения изнашивания хряща с применением липосом, практически полностью состоящих из фосфолипидных мембран, характеризующихся температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C.

Коммерчески доступные фармацевтические композиции для предотвращения и лечения остеоартрита, которые основаны на гиалуроновой кислоте в качестве активного ингредиента, включают, *среди прочего*, Antalvisc®, Kartilage® и Kartilage® Cross. Указанные фармацевтические композиции включают маннит в дополнение к НА. Было установлено, что маннит обладает способностью уменьшать разрушение НА в условиях окислительного стресса и, следовательно, его можно применять для значительного повышения внутрисуставного времени удержания инъецированной НА и улучшения эффективности повышения вязкости синовиальной жидкости при внутрисуставных инъекциях составов на основе НА (M. Rinaudo, B. Lardy, L. Grange, and T. Conrozier, *Polymers* **2014**, 6, 1948–1957). Клиническое исследование, в котором сравнивали как безопасность, так и эффективность внутрисуставного препарата, повышающего вязкость синовиальной жидкости, составленного из гиалуроновой кислоты с промежуточной молекулярной массой (MW), смешанной с высокой концентрацией маннита, и НА с высокой MW (Bio-НА) отдельно у пациентов с остеоартритом колена, показало, что маннит-содержащий препарат, повышающий вязкость синовиальной жидкости, был не менее эффективен, чем его препарат сравнения Bio-НА, с точки зрения ослабления боли и улучшения функции в течение шести месяцев, при этом не вызывал большего числа побочных эффектов (Conrozier,

Thierry et al. *The Knee*, 2016, 23 (5), 842–848). Влияние маннита на эффективность композиций препарата для повышения вязкости синовиальной жидкости на основе НА также изучалось Eymard et al., (Eymard F, Bossert M, Lecurieux R, Maillet B, Chevalier X, et al. (2016) Addition of Mannitol to Hyaluronic Acid may Shorten Viscosupplementation Onset of Action in Patients with Knee Osteoarthritis: Post-Hoc Analysis of A Double-blind, Controlled Trial. *J Clin Exp Orthop* 2: 21) и Conrozier, T. et al. (Role of high concentrations of mannitol on the stability of hyaluronan in an oxidative stress model induced by xanthine/xanthine oxidase Osteoarthritis and Cartilage, Volume 22, S478). Ferraccioli et al. показали, что ультрафиолетовое облучение синовиальной жидкости могло бы быть полезным способом скрининга эффекта нейтрализации свободных радикалов под действием лекарственных средств, поскольку оно индуцирует снижение вязкости, обусловленное образованием свободных радикалов. Защита вязкости синовиальной жидкости человека была опосредована супероксиддисмутазой, маннитом и каталазой (G.F. Ferraccioli, U. Ambanelli, P. Fietta, N. Giudicelli, C. Giori, Decrease of osteoarthritic synovial fluid viscosity by means of u.v. illumination: A method to evaluate the free radical scavenging action of drugs, *Biochemical Pharmacology*, 30, (13) 1981, 1805–1808).

Международная заявка на патент WO2012/001679 направлена на инъекционный фармацевтический состав для облегчения или уменьшения раздражения сустава или снижения ухудшения имеющегося воспаления сустава, который составлен для внутрисуставной инъекции и содержит полиол в качестве активного ингредиента, причем активный ингредиент полиол представляет собой ксилит. Эффективность ксилита в предотвращении раздражения сустава сравнивали с эффективностью маннита и глицерина, и было раскрыто, что раствор маннита или глицерина не предотвращал раздражение сустава при внутрисуставной инъекции в колено кролика.

Заявка на патент США 2014/0038917 направлена на стерильный и инъекционный водный состав для введения во внутрисуставное пространство сочленовного сустава субъекта, обеспечиваемый в форме геля, содержащего гиалуроновую кислоту или одну из ее солей и полиол, предпочтительно сорбит, в концентрации, равной или превышающей 7 мг/мл.

Международная заявка на патент WO2003/000191 относится к композиции, содержащей один или более гликозаминогликанов в комбинации с одним или более ингибиторами гиалуронидазы, где ингибиторы гиалуронидазы могут быть выбраны из гепарансульфата, декстрансульфата и сульфата ксилозы, и где гиалуроновая кислота может быть инкапсулирована в липосомах совместно с ингибитором гиалуронидазы, а также к способу лечения артрита с помощью такой композиции.

Известно, что инъекционные композиции на основе НА вызывают разные побочные эффекты, такие как затруднение движений, мышечная боль или скованность, боль в суставах и отек или покраснение сустава. Некоторые из побочных эффектов Antalvisc® включают проходящую боль и отек подвергнутого инъекции сустава после инъекции.

Следовательно, остается неудовлетворенная потребность в эффективной фармацевтической композиции для обеспечения смазывающей среды сустава, которая будет обеспечивать длительный эффект, при одновременном уменьшении вероятности побочных эффектов, ассоциированных с внутрисуставным введением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрен липосомальный состав для введения в синовиальные суставы, чтобы обеспечить смазывающую среду с целью уменьшения боли и раздражения и улучшения или восстановления подвижности суставов. В частности, липосомальный состав адаптирован для внутрисуставного введения. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента содержит липосомы, которые содержат фосфолипидные мембраны, характеризующиеся температурой фазового перехода, которая немного ниже физиологической температуры. Следовательно, при введении в синовиальный сустав липосомы находятся в жидкостно-разупорядоченной (LD) фазе. Фармацевтическая композиция дополнительно содержит регулирующее тоничность средство, которое представляет собой полиол. Регулирующее тоничность средство применяется для уменьшения локального раздражения за счет предотвращения осмотического шока в участке применения.

Отчасти настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что неионогенные регулирующие тоничность средства, которые добавляли к липосомальной композиции, обеспечивают улучшенную смазывающую среду сустава по сравнению с ионогенным регулирующим тоничность средством. В частности, добавление маннита к липосомальному составу увеличивало смазывающую эффективность композиции, в то же время применение хлорида натрия приводило к снижению смазывающей эффективности липосом. Эффект маннита оказался еще более неожиданным ввиду того факта, что фармацевтические композиции не содержат никакого дополнительного фармацевтически активного средства, кроме фосфолипидов самих по себе, и, в частности, не содержат гиалуроновую кислоту, активность которой, как известно, повышается за счет добавления полиолов. Добавление другого неионогенного полиола, в том числе, в частности, глицерина, также приводило к улучшению смазывающей способности липосомального состава по сравнению с применением хлорида натрия, хотя и в менее выраженной степени.

Таким образом, в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и липосомы, содержащие по меньшей мере одну мембрану, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C_{12} – C_{18} -углеводородные цепи, которые могут быть идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C_{12} – C_{18} -углеводородную цепь, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C ; где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства. Фармацевтическая композиция применима для обеспечения смазывающей среды сустава млекопитающего, характеризующегося температурой, которая превышает температуру фазового перехода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления регулирующее тоничность средство является неионогенным. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления полиол выбран из маннита и глицерина. В соответствии с конкретным вариантом осуществления регулирующее тоничность средство предусматривает маннит.

В другом аспекте предусмотрен способ обеспечения смазывающей среды сустава млекопитающего, причем способ включает введение в полость сустава фармацевтической композиции, содержащей регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и липосомы, содержащие по меньшей мере одну мембрану, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C₁₂-C₁₈-углеводородные цепи, которые могут быть идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C₁₂-C₁₈-углеводородную цепь, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C; где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства, где сустав характеризуется температурой сустава, которая превышает температуру фазового перехода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления регулирующее тоничность средство является неионогенным. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления полиол выбран из маннита и глицерина. В соответствии с конкретным вариантом осуществления регулирующее тоничность средство предусматривает маннит.

В другом аспекте предусмотрен способ лечения боли или раздражения сустава у субъекта, имеющего патологию сустава, причем способ включает обеспечение смазывающей среды сустава указанного субъекта посредством введения в полость сустава фармацевтической композиции, содержащей регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и липосомы, содержащие по меньшей мере одну мембрану, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C₁₂-C₁₈-углеводородные цепи, которые могут быть идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C₁₂-C₁₈-углеводородную цепь, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C; где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства, где сустав характеризуется температурой сустава, которая превышает температуру фазового перехода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления регулирующее тоничность средство является неионогенным. В соответствии с

дополнительными вариантами осуществления полиол выбран из маннита и глицерина. В соответствии с конкретным вариантом осуществления регулирующее тоничность средство предусматривает маннит.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение регулирующего тоничность средства, предусматривающего полиол; и липосом, практически полностью состоящих из по меньшей мере одной мембраны, содержащей по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C₁₂-C₁₈-углеводородные цепи, которые могут быть идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C₁₂-C₁₈-углеводородную цепь, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C; для получения фармацевтической композиции для обеспечения смазывающей среды сустава млекопитающих, характеризующегося температурой, которая превышает указанную температуру фазового перехода, где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления регулирующее тоничность средство является неионогенным. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления полиол выбран из маннита и глицерина. В соответствии с конкретным вариантом осуществления регулирующее тоничность средство предусматривает маннит.

В некоторых вариантах осуществления полиол не включает ксилит.

В некоторых вариантах осуществления полиол присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 5% (вес/вес) до приблизительно 50% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 20% (вес/вес) до приблизительно 40% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления глицерин присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 5% (вес/вес) до приблизительно 25% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В некоторых вариантах

осуществления фосфолипиды присутствуют в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 50% (вес/вес) до приблизительно 95% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция
5 дополнительно содержит жидкую среду, в которой диспергированы или суспендированы липосомы. В дополнительных вариантах осуществления полиол диспергирован или растворен в указанной жидкой среде. В еще одних дополнительных вариантах осуществления маннит растворен в указанной жидкой среде. Жидкая среда может быть выбрана из буфера и воды. В определенных
10 вариантах осуществления указанный буфер предусматривает гистидиновый буфер или забуференный фосфатом солевой раствор. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления указанный буфер предусматривает гистидиновый буфер.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция
15 представлена в форме фармацевтически приемлемой суспензии, содержащей липосомы, суспендированные в жидкой среде.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления концентрация полиола внутри липосомы практически такая же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления полиол присутствует в
20 фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,05% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления весовой процент полиола находится в диапазоне от приблизительно 0,1% (вес/вес) до
25 приблизительно 7% (вес/вес). В еще одних дополнительных вариантах осуществления весовой процент полиола находится в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 5% (вес/вес).

В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в
30 фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес) от общего веса

фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления весовой процент маннита находится в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес).

В некоторых вариантах осуществления глицерин присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,05% (вес/вес) до приблизительно 5% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления весовой процент глицерина находится в диапазоне от приблизительно 0,5% (вес/вес) до приблизительно 5% (вес/вес).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 600 мОсм. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно 300 мОсм. В таких определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция является изотонической.

В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции составляет приблизительно 5–8.

В некоторых вариантах осуществления весовое отношение липосом к полиолу находится в диапазоне от приблизительно 15:1 до приблизительно 1:1. В дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к манниту находится в диапазоне от приблизительно 10:1 до приблизительно 1:1. В дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к глицерину находится в диапазоне от приблизительно 15:1 до приблизительно 2:1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления липосомы имеют более одной мембраны. В таких определенных вариантах осуществления липосомы представляют собой многослойные везикулы (MLV).

В некоторых вариантах осуществления GPL содержит две ацильные цепи. В дополнительных вариантах осуществления указанные цепи выбраны из группы, состоящей из C₁₄-, C₁₅-, C₁₆- и C₁₈-ацильных цепей. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна из указанных углеводородных цепей является

насыщенной углеводородной цепью. В дополнительных вариантах осуществления две углеводородные цепи являются насыщенными.

В некоторых вариантах осуществления PL представляет собой фосфатидилхолин (PC). В дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DMPC).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана дополнительно содержит PC, выбранный из группы, состоящей из 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (C15), 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) и N-пальмитоил-D-эритро-сфингозилфосфорилхолина (D-эритро C16). В некоторых вариантах осуществления мольный процент DMPC в по меньшей мере одной мембране находится в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 75%.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и DPPC. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DPPC находится в диапазоне от приблизительно 25:75 до приблизительно 70:30. В определенных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DPPC составляет приблизительно 45:55.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и C15. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к C15 находится в диапазоне от приблизительно 25:75 до приблизительно 45:55.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и DSPC. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DSPC составляет приблизительно 75:25.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и D-эритро C16. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 находится в диапазоне от приблизительно 10:90 до приблизительно 25:75.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит C15.

Общая концентрация фосфолипидов в фармацевтической композиции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения находится в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно 300 мМ. В определенных вариантах осуществления общая концентрация фосфолипидов находится в диапазоне от приблизительно 100 мМ до приблизительно 200 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды присутствуют в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,5% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления весовой процент фосфолипидов находится в диапазоне от приблизительно 3% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес).

В некоторых вариантах осуществления липосомы характеризуются средним диаметром от приблизительно 0,5 мкм до приблизительно 10 мкм.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода от приблизительно 30°C до приблизительно 35°C.

В некоторых вариантах осуществления температура суспензии находится в диапазоне температур, которые на приблизительно 1–15°C превышают указанную температуру фазового перехода.

В некоторых вариантах осуществления, предпочтительных в настоящем документе, фармацевтическая композиция практически не содержит гиалуроновой кислоты.

В определенных вариантах осуществления липосомы практически полностью состоят из по меньшей мере одной мембраны, содержащей по меньшей мере один фосфолипид (PL), как подробно описано выше.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит MLV-липосомы, мембраны которых состоят практически полностью из DMPC и DPPC; маннит и гистидиновый буфер. В дополнительных вариантах осуществления DMPC присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до

приблизительно 10% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В еще
одних дополнительных вариантах осуществления DPPC присутствует в
фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от
приблизительно 2% (вес/вес) до приблизительно 12% (вес/вес) от общего веса
5 фармацевтической композиции. В еще одних дополнительных вариантах
осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом
проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до
приблизительно 7% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления обеспечение смазывающей среды
10 сустава предназначено для лечения патологии суставов или симптомов, возникающих
при этом. В дополнительных вариантах осуществления патология сустава выбрана из
группы, состоящей из артрита, остеоартрита, остеоартрита у пациентов с
ревматоидным артритом, травматического повреждения сустава, заблокированного
сустава, спортивной травмы, состояния после артроцентеза, артроскопической
15 операции, операции на открытом суставе и замены сустава. Каждый вариант
представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В
определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция
предназначена для уменьшения боли в коленном суставе у пациентов с
остеоартритом.

20 В некоторых вариантах осуществления обеспечение смазывающей среды
предназначено для предотвращения изнашивания сустава.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления фармацевтическая
композиция представляет собой фармацевтическую композицию для парентерального
введения, содержащую суспензию липосом. Фармацевтическая композиция может
25 находиться в форме, подходящей для введения путем внутрисуставной инъекции,
артроскопического введения или хирургического введения. Каждый вариант
представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Фармацевтическую композицию в соответствии с различными вариантами
осуществления настоящего изобретения можно вводить в дозе от приблизительно
30 0,5 мл до приблизительно 10 мл. В дополнительных вариантах осуществления
фармацевтическую композицию вводят в дозе от приблизительно 1 мл до

приблизительно 6 мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе, составляющей приблизительно 3 мл.

В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 20 мг до приблизительно 350 мг маннита. В определенных вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 120 мг маннита.

В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 50 мг до приблизительно 1000 мг фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 50 мг до приблизительно 500 мг DPPC. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 40 мг до приблизительно 300 мг DMPC.

Дополнительные варианты осуществления и полный объем применимости настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания, приведенного ниже. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку разные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из данного подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1** показаны исходные термограммы дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) изотонических и гипотонических липосомальных композиций, содержащих DMPC/DPPC.

На **фигуре 2** показаны исходные термограммы дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) изотонических и гипотонических липосомальных композиций, содержащих C15.

Фигура 3 представляет собой гистограмму, на которой показан диапазон температур фазового перехода из SO в LD для липосом, содержащих различные

смеси фосфолипидов, которые оценивали по сканограммам DSC. Серая область указывает на диапазон температур 20°C – 39°C.

На **фигуре 4** показаны профили хрящевых штифтов до и после теста на изнашивание в жидкости на основе белка. Положение появляющейся субхондральной кости отмечено стрелкой. Шкала не показывает действительную высоту, поскольку профили смещены для лучшей наглядности.

На **фигуре 5A–5B** показаны оптические изображения хрящевого штифта № 9 до (**фигура 5A**) и через 12 часов после (**фигура 5B**) теста на изнашивание в жидкости на основе белка. За пределами наружного хрящевого кольца появлялась субхондральная кость там, где хрящ был перетертым (отмечено стрелкой).

На **фигуре 6** показаны профили хрящевых штифтов до и после теста на изнашивание в липосомальной композиции. Шкала не показывает действительную высоту, поскольку профили смещены для лучшей наглядности.

На **фигуре 7A–7B** показаны оптические изображения хрящевого штифта № 14 до (**фигура 7A**) и через 6 часов после (**фигура 7B**) теста на изнашивание в липосомальной композиции.

На **фигуре 8A–8B** показаны оптические изображения хрящевого штифта № 17 до (**фигура 8A**) и через 12 часов после (**фигура 8B**) теста на изнашивание в липосомальной композиции.

На **фигуре 9A–9B** представлен график сравнения потери массы (**фигура 9A**) и потери высоты (**фигура 9B**) при использовании композиции на основе белка по сравнению с липосомальной композицией. Планки погрешностей представляют собой приблизительную оценку точности измерений.

На **фигуре 10A–10B** показаны профили поверхностей хрящей до и после теста на изнашивание в жидкости на основе белка (**фигура 10A**) и в липосомальной композиции (**фигура 10B**).

На **фигуре 11** показаны параметры шероховатости Ra (●), Rk (◆), Rpk (▲) и Rvk (▼) до ($t=0$) и после испытания на изнашивание (6 ч и 12 ч) для штифтов 13–18, которые тестировали в липосомальной композиции, где Ra обозначает среднее арифметическое отклонение профиля шероховатости, а Rk обозначает базовую

глубину шероховатости (глубину шероховатости за исключением значения самого высокого пика (Rpk) и нижней впадины (Rvk)).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрен липосомальный состав для применения в обеспечении смазывающей среды суставов млекопитающих, причем указанная смазывающая среда обеспечивает уменьшение боли и раздражения и позволяет улучшить или восстановить подвижность сустава и снизить изнашивание сустава. Дополнительно фармацевтическая композиция может применяться для лечения, ведения или предотвращения патологии или патологического состояния сустава. Фармацевтическая композиция в соответствии с принципами настоящего изобретения основана на липосомальной композиции, характеризующейся определенной температурой фазового перехода мембран липосом, причем указанная температура ниже температуры сустава.

Используемый в данном документе термин «температура фазового перехода» в некоторых вариантах осуществления относится к температуре, при которой в липосоме происходит переход от упорядоченной твердой (SO) к жидкой неупорядоченной (LD) фазе. Температуру фазового перехода липосом можно оценивать с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Разные параметры термограммы DSC, которые могут рассматриваться для оценки температуры фазового перехода, включают T_{on} , который представляет температуру, при которой начинается фазовый переход SO-LD, и T_{off} , который представляет температуру, при которой заканчивается фазовый переход SO-LD на сканограммах нагревания, а также T_p и T_m , которые представляют температуру, при которой происходит максимальное изменение теплоемкости в момент, предшествующий переходу (T_p), и в момент основного перехода (T_m) соответственно.

В состав многослойных везикул липосом входят разные PC с двумя C_{12} - C_{16} углеводородными цепями, при этом ранее было показано, что они являются эффективными смазывающими веществами для хряща и средствами для снижения изнашивания сустава при температуре, которая немного превышает (например, на приблизительно 1°C , 2°C , 3°C , 5°C , 8°C , 11°C и иногда до приблизительно 15°C) температуру перехода от SO к LD фазе (как подробно описано в патенте США

8895054, содержание которого полностью настоящим включено посредством ссылки во всей своей полноте). Фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат неионогенное регулирующее тоничность средство, которое повышает осмолярность композиции.

5 Неожиданно было обнаружено, что смазывающая эффективность фармацевтической композиции, содержащей неионогенный полиол, была значительно выше по сравнению с фармацевтической композицией, содержащей ионогенное регулирующее тоничность средство, и в частности, соль хлорида натрия. Положительный эффект полиолов по сравнению с хлоридом натрия был совершенно
10 непредвиденным, поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не основана на гиалуроновой кислоте, активность которой, как известно, повышается за счет добавления полиолов.

Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что добавление маннита не изменяло температуру фазового перехода мембран липосом. Без привязки к
15 определенной теории или механизму действия можно предположить, что неожиданный эффект добавления полиола не связан напрямую с температурой фазового перехода липосомы, которая, как ранее сообщалось, является существенным признаком, обеспечивающим ее смазывающую способность.

Таким образом, в соответствии с аспектом настоящего изобретения
20 предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и липосому, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL) или сфинголипида (SPL) и характеризующийся температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, где фармацевтическая
25 композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предусмотрена для применения в обеспечении смазывающей среды сустава млекопитающего.

В другом аспекте предусмотрен способ обеспечения смазывающей среды
30 сустава млекопитающего, причем способ включает введение в полость сустава фармацевтической композиции, содержащей регулирующее тоничность средство,

предусматривающее полиол; и липосому, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL) или сфинголипида (SPL), характеризующийся температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, где фармацевтическая композиция
5 практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства.

В другом аспекте предусмотрен способ лечения боли или раздражения сустава у субъекта, имеющего патологию сустава, причем способ включает обеспечение смазывающей среды сустава указанного субъекта посредством введения в полость сустава фармацевтической композиции, содержащей регулирующее тоничность
10 средство, предусматривающее полиол; и липосому, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL) или сфинголипида (SPL), характеризующийся температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C, где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение регулирующего тоничность средства, предусматривающего полиол, и липосомы, которая содержит по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL) или сфинголипида (SPL), характеризующийся температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до
15 приблизительно 39°C, для получения фармацевтической композиции для обеспечения смазывающей среды сустава млекопитающего, где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства.

Используемый в данном документе термин «регулирующее тоничность средство» в некоторых вариантах осуществления относится к регулируемому
25 тоничность средству, которое подходит для применения в фармацевтических композициях для внутрисуставной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления регулирующее тоничность средство является неионогенным. В некоторых вариантах осуществления полиол представляет собой линейный полиол. В некоторых вариантах осуществления полиол представляет собой циклический полиол. Неограничивающие примеры неионогенных полиолов,
30

подходящих для применения в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают маннит, глицерин, декстрозу, лактозу и трегалозу.

В некоторых вариантах осуществления, предпочтительных в настоящем патенте, полиол представляет собой маннит. Маннит представляет собой
5 общепринятое и недорогое вспомогательное вещество, часто применяемое разработчиками лекарств в разных типах фармацевтических композиций. Как было упомянуто в данном документе выше, маннит применялся в комбинации с гиалуроновой кислотой в фармацевтических композициях для обеспечения смазывающей среды сустава. Также сообщалось, что маннит является применимым
10 при криоконсервации липосом (Talsma H, van Steenberg MJ, Salemink PJ, Crommelin DJ, Pharm Res. 1991, 8 (8):1021–6).

В некоторых вариантах осуществления регулирующее тоничность средство предусматривает глицерин.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция
15 содержит комбинацию полиолов, т.е. комбинацию маннита и глицерина. Фармацевтическая композиция может дополнительно включать комбинацию полиола с дополнительным регулирующим тоничность средством.

В некоторых вариантах осуществления полиол не включает ксилит.

Следует подчеркнуть, что в соответствии с некоторыми вариантами
20 осуществления, предпочтительными в настоящем изобретении, регулирующее тоничность средство не инкапсулировано внутри липосом. Используемый в данном документе термин «инкапсулированный» в некоторых вариантах осуществления относится к концентрации регулирующего тоничность средства внутри липосомы, которая значительно выше, чем в среде за пределами липосомы. Термин «внутри
25 липосомы» следует понимать как охватывающий по меньшей мере одну внутреннюю водную фазу липосомы. Термин «концентрация» может включать осмотическую концентрацию. Используемый в данном документе термин «значительно выше» в некоторых вариантах осуществления относится к разнице в концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 90%. В некоторых вариантах
30 осуществления полиол не инкапсулирован внутри липосом. В дополнительных

вариантах осуществления маннит не инкапсулирован внутри липосом. В дополнительных вариантах осуществления глицерин не инкапсулирован внутри липосом.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления концентрация регулирующего тоничность средства внутри липосомы практически такая же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. Используемый в данном документе термин «практически такая же» в некоторых вариантах осуществления относится к разнице в концентрации, составляющей менее приблизительно 15%. В дополнительных вариантах осуществления термин «практически такая же» относится к разнице в концентрации, составляющей менее приблизительно 10%, менее приблизительно 5%, менее приблизительно 2,5% или менее приблизительно 1%. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления концентрация полиола внутри липосомы практически такая же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В соответствии с еще одними дополнительными вариантами осуществления концентрация маннита внутри липосомы практически такая же, как концентрация маннита в среде за пределами липосомы. В соответствии с еще одними дополнительными вариантами осуществления концентрация глицерина внутри липосомы практически такая же, как концентрация глицерина в среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления липосомы не подвергнуты лиофилизации. В дополнительных вариантах осуществления липосомы не подвергнуты лиофилизации и/или оттаиванию перед введением в сустав.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит жидкую среду. В некоторых вариантах осуществления липосомы диспергированы или суспендированы в указанной жидкой среде. В дополнительных вариантах осуществления регулирующее тоничность средство растворено или диспергировано в указанной жидкой среде. В дополнительных вариантах осуществления маннит или глицерин растворены в указанной жидкой среде. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция

представлена в форме фармацевтически приемлемой суспензии, содержащей липосомы, суспендированные в жидкой среде.

Дополнительно предусмотрена фармацевтически приемлемая суспензия, содержащая фармацевтическую композицию в соответствии с разными вариантами осуществления, указанными в данном документе выше, и дополнительно содержащая жидкую среду.

В некоторых вариантах осуществления полиол присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 5% (вес/вес) до приблизительно 50% (вес/вес) или от приблизительно 10% (вес/вес) до приблизительно 40% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления полиол присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 30% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления полиол присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 15% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 10% (вес/вес) до приблизительно 50% (вес/вес) или от приблизительно 20% (вес/вес) до приблизительно 50% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 30% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления глицерин присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 5% (вес/вес) до приблизительно 35% (вес/вес) или от приблизительно 5% (вес/вес) до приблизительно 25% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления глицерин присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 15% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды, образующие липосому, присутствуют в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 50% (вес/вес) до приблизительно 95% (вес/вес) или от приблизительно 60% (вес/вес) до приблизительно 85% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления фосфолипиды присутствуют в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 70% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В дополнительных вариантах осуществления фосфолипиды присутствуют в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 85% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции.

Используемый в данном документе термин «сухой вес» в некоторых вариантах осуществления относится к весу фармацевтической композиции, которая не включает жидкую среду. В дополнительных вариантах осуществления термин «сухой вес» относится к весу фармацевтической композиции, которая не включает воду.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению являются фармацевтически приемлемыми. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» в некоторых вариантах осуществления относится к любому составу, который является безопасным и обеспечивает соответствующую доставку для предпочтительного пути введения эффективного количества активного ингредиента для применения в настоящем изобретении. Данный термин также относится к применению забуференных составов, где рН поддерживается на определенном предпочтительном значении, находящемся в диапазоне от рН 4,0 до рН 9,0, согласующимся со стабильностью соединений и путем введения.

Следовательно, жидкая среда может быть выбрана из буфера, воды и солевого раствора. В некоторых вариантах осуществления жидкая среда предусматривает буфер. В определенных вариантах осуществления указанный буфер предусматривает гистидиновый буфер или забуференный фосфатом солевой раствор. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Концентрация гистидина может находиться в диапазоне от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл. В определенных вариантах осуществления

концентрация гистидина составляет приблизительно 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация гистидина находится в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ. В определенных вариантах осуществления концентрация гистидина составляет приблизительно 10 мМ. Гистидин может присутствовать в композиции в форме растворенной хлористоводородной или ацетатной соли. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит следовые количества неорганических кислот, таких как, например, хлористоводородная кислота.

pH фармацевтической композиции может находиться в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления pH находится в диапазоне от приблизительно 6 до приблизительно 7. В определенных вариантах осуществления pH фармацевтической композиции составляет приблизительно 6,5.

В некоторых вариантах осуществления концентрация полиола в фармацевтической композиции находится в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 70 мг/мл. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 2,5 до приблизительно 60 мг/мл. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/мл. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 30 до приблизительно 50 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита в фармацевтической композиции находится в диапазоне от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления концентрация маннита находится в диапазоне от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация маннита находится в диапазоне от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно

50 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита составляет приблизительно 40 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления концентрация маннита составляет приблизительно 20 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация глицерина в фармацевтической композиции находится в диапазоне от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления концентрация глицерина находится в диапазоне от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация глицерина находится в диапазоне от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация глицерина составляет приблизительно 20 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления концентрация глицерина составляет приблизительно 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления концентрация полиола в фармацевтической композиции находится в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно 500 мМ. В дополнительных вариантах осуществления концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 400 мМ. В еще одних дополнительных вариантах осуществления, концентрация полиола находится в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 300 мМ. Полиол может быть выбран из маннита и глицерина.

В некоторых вариантах осуществления полиол присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,05% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес), от приблизительно 0,1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес), от приблизительно 0,5% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес) или от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 5% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления весовой процент полиола составляет приблизительно 4% (вес/вес). В дополнительных вариантах осуществления весовой процент полиола составляет приблизительно 2% (вес/вес).

В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес), от приблизительно

0,5% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес) или от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления весовой процент маннита составляет приблизительно 4% (вес/вес).

5 В некоторых вариантах осуществления глицерин присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,05% (вес/вес) до приблизительно 5% (вес/вес) или от приблизительно 0,5% (вес/вес) до приблизительно 5% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления весовой
10 процент глицерина составляет приблизительно 2% (вес/вес).

Используемый в данном документе термин «общий вес» в некоторых вариантах осуществления относится к весу фармацевтической композиции, содержащей жидкую среду. В дополнительных вариантах осуществления термин «общий вес» относится к весу фармацевтически приемлемой суспензии.

15 В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 600 мОсм. В дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 250 до приблизительно 500 мОсм. В дополнительных вариантах
20 осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 250 до приблизительно 400 мОсм. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно 300 мОсм. В таких определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция является изотонической.

25 В некоторых вариантах осуществления весовое отношение липосом к полиолу находится в диапазоне от приблизительно 30:1 до приблизительно 1:2. В дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к полиолу находится в диапазоне от приблизительно 15:1 до приблизительно 2:1. В еще одних дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к полиолу
30 находится в диапазоне от приблизительно 10:1 до приблизительно 2:1. В еще одних дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к полиолу

находится в диапазоне от приблизительно 6:1 до приблизительно 2:1. В дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к полиолу находится в диапазоне от приблизительно 10:1 до приблизительно 6:1.

В некоторых вариантах осуществления весовое отношение липосом к манниту находится в диапазоне от приблизительно 10:1 до приблизительно 1:1. В дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к манниту находится в диапазоне от приблизительно 6:1 до приблизительно 2:1. В определенных вариантах осуществления весовое отношение липосом к манниту составляет приблизительно 4:1.

В некоторых вариантах осуществления весовое отношение липосом к глицерину находится в диапазоне от приблизительно 15:1 до приблизительно 2:1. В дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к глицерину находится в диапазоне от приблизительно 12:1 до приблизительно 2:1. В еще одних дополнительных вариантах осуществления весовое отношение липосом к глицерину находится в диапазоне от приблизительно 10:1 до приблизительно 6:1.

В некоторых вариантах осуществления рН фармацевтической композиции можно регулировать за счет неорганической кислоты или основания. Неограничивающие примеры подходящих неорганических оснований включают гидроксид натрия и гидроксид калия. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения GPL содержит группу фосфохолиновой «головки» (фосфатидилхолин, липид на основе PC) или группу фосфоглицериновой «головки» (фосфатидилглицерин, липид на основе PG), а SPL представляет собой церамид (N-ацил сфингозин, несущий группу фосфохолиновой «головки», также называемый N-ацил сфингозин-фосфохолин (липид на основе SM)).

PC и SM представляют собой цвиттер-ионные фосфолипиды с катионным холиновым фрагментом и анионным диэфирным фосфатным фрагментом (составляющими группу фосфохолиновой «головки»). Гидрофобная часть PC и PG включает 2 углеводородные (например, ацильные и алкильные) цепи. SM также имеет

две гидрофобные углеводородные цепи, из которых одна представляет собой цепь сфингоидного основания самого по себе, а другая представляет собой N-ацильную цепь. Все PC, SM и PG, в которых углеводородные цепи содержат более 12 атомов углерода, имеют форму, подобную цилиндрической, так как их параметр упаковки находится в диапазоне 0,74-1,0. Они образуют липидные бислои, которые при температуре, превышающей температуру перехода из SO в LD фазу, становятся высокогидратированными и содержащими пузыри с образованием липидных везикул (липосом). Бислои липосом из PC и PG могут находиться либо в твердой упорядоченной (SO) фазе, либо в жидкой неупорядоченной (LD). Превращение фаз SO в LD охватывает эндотермический фазовый переход первого рода, называемый основным фазовым переходом. T_m представляет собой температуру, при которой происходит максимальное изменение теплоемкости при переходе из SO в LD фазу. T_m и температурный диапазон перехода PL из SO в LD фазу зависят, *среди прочего*, от состава углеводородной цепи PL. В LD фазе (но не в SO фазе) заряженная группа фосфохолиновой и фосфоглицериновой «головки» находится в высокогидратированном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления термин «температура фазового перехода» относится к T_m . В других вариантах осуществления термин «температура фазового перехода» относится к температурному диапазону перехода из SO в LD фазу.

Кроме того, отмечается, что PG и SM характеризуются T_m , которая аналогична таковой у соответствующего PC (с такой же длиной замещающей углеводородной цепи(-ей)). Например, T_m у 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфорилглицерина (DMPG) идентична таковой у DMPC, а именно, 23°C, и таковая у 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфорилглицерина (DPPG) или N-пальмитоил-SM идентична таковой у DPPC, а именно, 41°C. Таким образом, хотя в следующих примерах используются в основном липиды на основе PC, PL в соответствии с настоящим изобретением может также представлять собой липид на основе PG или SM.

В соответствии с принципами настоящего изобретения может применяться смесь двух или более PL (например, двух различных PC, PC с PG, двух различных PG, двух SM, PC или PG с SM и т. д.) при условии, что образованная смесь находится в

состоянии LD, находясь *in situ* (например, в сочленовой области здорового сустава или сустава с дисфункцией).

В некоторых конкретных вариантах осуществления липосома содержит PC. В дополнительных конкретных вариантах осуществления липосома содержит комбинацию двух различных PC. В других конкретных вариантах осуществления липосома содержит комбинацию PC и SM.

В некоторых вариантах осуществления липосомы отличаются тем, что они содержат по меньшей мере одну мембрану, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL) с двумя одинаковыми или различными C₁₂–C₁₈-углеводородными цепями и сфинголипида (SPL) с C₁₂–C₁₈-углеводородной цепью. Температура фазового перехода, при которой происходит переход из твердой упорядоченной (SO) в жидкую неупорядоченную (LD) фазу, находится в пределах температурного диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C. Липосомы применяют для обеспечения смазывающей среды суставов, которые характеризуются температурой сустава, превышающей температуру фазового перехода. Соответственно внутри сустава липосомы находятся в LD фазе.

Следует отметить, что вышеуказанные условия являются взаимодополняющими, а именно, выбор PL (либо одного PL, либо комбинации PL с дополнительными PL), входящего в состав липосомы, должен быть таким, чтобы липосома характеризовалась температурой фазового перехода SO-LD от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C.

GPL или SPL могут иметь алкильную, алкенильную или ацильную C₁₂–C₁₈-углеводородную цепь. В случае GPL две цепи могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления GPL имеет C₁₂–C₁₆-углеводородные цепи. В дополнительных вариантах осуществления SPL имеет C₁₂–C₁₆-углеводородные цепи.

Один конкретный вариант осуществления касается фармацевтической композиции, содержащей липосомы, имеющие GPL или SPL с по меньшей мере одной C₁₄-ацильной цепью. Другой конкретный вариант осуществления касается

фармацевтической композиции, содержащей липосомы, имеющие GPL или SPL с по меньшей мере одной C₁₅-ацильной цепью. Еще один конкретный вариант осуществления касается фармацевтической композиции, содержащей GPL с по меньшей мере одной из C₁₄-, C₁₅-, C₁₆- и C₁₈-ацильных цепей. Еще один другой конкретный вариант осуществления касается фармацевтической композиции, содержащей липосомы, имеющие SPL с C₁₆-ацильной цепью. Дополнительные варианты осуществления касаются фармацевтической композиции, содержащей комбинацию из любых вышеуказанных липосом.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна гидрофобная C₁₂-C₁₈- или C₁₂-C₁₆-цепь является насыщенной. В дополнительных вариантах осуществления обе гидрофобные C₁₂-C₁₈- и C₁₂-C₁₆-цепи являются насыщенными.

В одном варианте осуществления указанные гидрофобные C₁₂-C₁₈- или C₁₂-C₁₆-цепи являются ненасыщенными.

Неограничивающие примеры фосфолипидов, которые могут присутствовать в липосоме в соответствии с принципами настоящего изобретения, включают 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DMPC, $T_m \sim 24^\circ\text{C}$); 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC, $T_m 41,4^\circ\text{C}$); 1,2-дипентадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (C₁₅, $T_m 33,0^\circ\text{C}$); 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), $T_m 55^\circ\text{C}$) и N-пальмитоил-D-эритро-сфингозилфосфорилхолин (D-эритро C₁₆, $T_m 41,0^\circ\text{C}$). Значения T_m для разных липидов на основе PC можно найти в «Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins», John R. Silvius, Lipid-Protein Interactions, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982, а также в Lipid Thermotropic Phase Transition Data Base – LIPIDAT и в Marsh (1990).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при использовании смеси двух или более PL мольное отношение между ними планируется так, чтобы T_m комбинации обеспечивало липосому в LD фазе при введении фармацевтической композиции в сустав. В дополнительных вариантах осуществления мольное отношение выбрано так, чтобы обеспечить липосому с температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C.

В некоторых вариантах осуществления липосома содержит DMPC. В дополнительных вариантах осуществления липосома практически полностью состоит из DMPC. В еще одних дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана липосомы практически полностью состоит из DMPC. В 5 дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC, включает регулирующее тоничность средство, характеризующееся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью 10 состоящая из DMPC, включает полиол, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В еще одних дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC, включает маннит, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация маннита в 15 среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит липосому, содержащую комбинацию DMPC и дополнительного PC. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит липосому, содержащую комбинацию DMPC и SPM.

В некоторых вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране липосоме находится в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 100%. В дополнительных вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране липосомы находится в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 80%. В дополнительных вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране 25 липосомы находится в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 75%, от приблизительно 15% до приблизительно 70%, от приблизительно 20% до приблизительно 65%, от приблизительно 25% до приблизительно 60%, от приблизительно 30% до приблизительно 55%, от приблизительно 35% до приблизительно 50%, от приблизительно 5% до приблизительно 15%, от 30 приблизительно 20% до приблизительно 30%, от приблизительно 5% до приблизительно 30%, от приблизительно 40% до приблизительно 50% или от

приблизительно 70% до приблизительно 80%. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране липосомы составляет приблизительно 10%. В других иллюстративных вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране липосомы составляет приблизительно 25%. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране липосомы составляет приблизительно 45%. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления мольный процент DMPC в мембране липосомы составляет приблизительно 75%.

В некоторых вариантах осуществления липосома содержит комбинацию DMPC и DPPC. В дополнительных вариантах осуществления липосома практически полностью состоит из DMPC и DPPC. В еще одних дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана липосомы практически полностью состоит из DMPC и DPPC. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и DPPC, включает регулирующее тоничность средство, характеризующееся концентрацией внутри липосомы практической такой же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и DPPC, включает полиол, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В еще одних дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и DPPC, включает маннит, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация маннита в среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DPPC находится в диапазоне от приблизительно 25:75 до приблизительно 70:30. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DPPC находится в диапазоне от приблизительно 30:70 до приблизительно 65:25, от приблизительно 35:65 до приблизительно 60:30 или от приблизительно 40:60 до приблизительно 55:45. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления

отношение мольных процентов DMPC к DPPC составляет приблизительно 45:55. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DPPC составляет приблизительно 25:75.

В некоторых вариантах осуществления температура фазового перехода липосомы, содержащей комбинацию DMPC и DPPC, находится в диапазоне от приблизительно 33°C до приблизительно 37°C.

В некоторых вариантах осуществления липосома содержит комбинацию DMPC и C15. В дополнительных вариантах осуществления липосома практически полностью состоит из DMPC и C15. В еще одних дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана липосомы практически полностью состоит из DMPC и C15. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и C15, включает регулирующее тоничность средство, характеризующееся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и C15, включает полиол, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В еще одних дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и C15, включает маннит, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация маннита в среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к C15 находится в диапазоне от приблизительно 15:85 до приблизительно 55:45. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к C15 находится в диапазоне от приблизительно 25:75 до приблизительно 45:55. В определенных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к C15 составляет приблизительно 45:55. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к C15 составляет приблизительно 25:75.

В некоторых вариантах осуществления температура фазового перехода липосомы, содержащей комбинацию DMPC и C15, находится в диапазоне от приблизительно 29°C до приблизительно 31°C.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и DSPC. В дополнительных вариантах осуществления липосома практически полностью состоит из DMPC и DSPC. В еще одних дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана липосомы практически полностью состоит из DMPC и DSPC. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и DSPC, включает регулирующее тоничность средство, характеризующееся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и DSPC, включает полиол, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В еще одних дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и DSPC, включает маннит, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация маннита в среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к DSPC составляет приблизительно 75:25.

В некоторых вариантах осуществления температура фазового перехода липосомы, содержащей комбинацию DMPC и DSPC, составляет приблизительно 27°C.

В некоторых вариантах осуществления липосома содержит комбинацию DMPC и *D-эритро* C16. В дополнительных вариантах осуществления липосома практически полностью состоит из DMPC и *D-эритро* C16. В еще одних дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана липосомы практически полностью состоит из DMPC и *D-эритро* C16. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и *D-эритро* C16, включает регулирующее тоничность средство, характеризующееся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью

состоящая из DMPC и D-эритро C16, включает полиол, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В еще одних дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из DMPC и D-эритро C16, включает маннит, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация маннита в среде за пределами липосомы.

В некоторых вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 находится в диапазоне от приблизительно 5:95 до приблизительно 50:50. В дополнительных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 находится в диапазоне от приблизительно 10:90 до приблизительно 45:55, от приблизительно 10:90 до приблизительно 40:60, от приблизительно 10:90 до приблизительно 35:65, от приблизительно 10:90 до приблизительно 30:70 или от приблизительно 10:90 до приблизительно 25:75. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 находится в диапазоне от приблизительно 5:95 до приблизительно 50:50. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 составляет приблизительно 10:90. В других иллюстративных вариантах осуществления отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 составляет приблизительно 25:75.

В некоторых вариантах осуществления температура фазового перехода липосомы, содержащей комбинацию DMPC и D-эритро C16, находится в диапазоне от приблизительно 27°C до 32°C.

В некоторых вариантах осуществления липосома содержит C15. В дополнительных вариантах осуществления липосома практически полностью состоит из C15. В еще одних дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна мембрана липосомы практически полностью состоит из C15. В дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью состоящая из C15, включает регулирующее тоничность средство, характеризующееся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация регулирующего тоничность средства в среде за пределами липосомы. В дополнительных вариантах

осуществления липосома, практически полностью состоящая из C15, включает полиол, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация полиола в среде за пределами липосомы. В еще одних дополнительных вариантах осуществления липосома, практически полностью

5 состоящая из C15, включает маннит, характеризующийся концентрацией внутри липосомы практически такой же, как концентрация маннита в среде за пределами липосомы.

Общая концентрация PL в фармацевтической композиции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения находится в

10 диапазоне от приблизительно 20 мМ до приблизительно 500 мМ. В дополнительных вариантах осуществления концентрация находится в диапазоне от приблизительно 50 мМ до приблизительно 300 мМ. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация находится в диапазоне от приблизительно 100 мМ до

15 приблизительно 200 мМ. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация находится в диапазоне от приблизительно 130 мМ до приблизительно 170 мМ. В определенных вариантах осуществления общая концентрация PL составляет приблизительно 150 мМ.

В некоторых вариантах осуществления общая концентрация PL находится в диапазоне от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 500 мг/мл. В

20 дополнительных вариантах осуществления концентрация находится в диапазоне от приблизительно 30 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл. В еще одних дополнительных вариантах осуществления концентрация находится в диапазоне от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В определенных вариантах осуществления общая концентрация PL составляет приблизительно 100 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фосфолипиды, образующие липосомы, присутствуют в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в

25 диапазоне от приблизительно 0,1% (вес/вес) до приблизительно 40% (вес/вес), от приблизительно 0,5% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес), от приблизительно 3% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес) или от приблизительно 1% (вес/вес) до

30 приблизительно 20% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления фосфолипиды, образующие липосомы,

присутствуют в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 10% (вес/вес).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления липосомы, подходящие для применения в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, не содержат в своих бислоях мембраноактивный стерол, такой как холестерин. Следует отметить, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно не содержит пропиленгликоль. Кроме того, следует отметить, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно не содержит декстран.

10 Дополнительно следует подчеркнуть, что липосомы, применяемые в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, сами по себе применяются в качестве активного ингредиента, а не в качестве носителя для определенного фармацевтически активного средства. В связи с этим и как указано в данном документе выше, фармацевтические композиции в соответствии с

15 принципами настоящего изобретения практически не содержат дополнительного фармацевтически активного средства. Используемый в данном документе термин «практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства» в некоторых вариантах осуществления относится к фармацевтической композиции, включающей менее терапевтически эффективного количества фармацевтически

20 активного средства, которое известно для применения в обеспечении смазывающей среды сустава, лечения дисфункции сустава, уменьшения боли, раздражения и/или изнашивания сустава или любой их комбинации. Используемый в данном документе термин «известный для применения» в некоторых вариантах осуществления

25 относится к фармацевтически активному средству, одобренному для указанного применения на момент настоящего изобретения. В дополнительных вариантах осуществления термин «известный для применения» относится к фармацевтически активным средствам, которые будут одобрены для указанного применения в будущем. В еще одних дополнительных вариантах осуществления термин «известный для применения» относится к фармацевтически активным средствам, которые

30 упомянуты в научной литературе и/или патентах как подходящие для указанного применения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой средство для обеспечения смазывающей среды, такое как, *среди прочего*, гликозаминогликан или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир или производное. В определенных вариантах осуществления указанный гликозаминогликан представляет собой гиалуроновую кислоту или гиалуронансодержащую соль или сложный эфир. В определенных вариантах осуществления гиалуроновая кислота не инкапсулирована внутри липосомы. В качестве дополнения или альтернативы гиалуроновая кислота не должна быть диспергирована в жидкой среде. В некоторых вариантах осуществления, предпочтительных в настоящем изобретении, фармацевтическая композиция практически не содержит гиалуроновую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир. Используемый в сочетании с гиалуроновой кислотой термин «практически не содержит» в некоторых вариантах осуществления относится к фармацевтической композиции, включающей менее терапевтически эффективного количества гиалуроновой кислоты, или ее соли, или сложного эфира. В дополнительных вариантах осуществления термин «практически не содержит» относится к фармацевтической композиции, включающей менее обнаруживаемого количества гиалуроновой кислоты, или ее соли, или сложного эфира.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой средство для обеспечения смазывающей среды, выбранное из белка поверхностной зоны (SZP), лубрицина, протеогликана-4 и их аналогов и производных.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой противовоспалительное средство, такое как ксилит, бетаметазон, преднизолон, пироксикам, аспирин, флурбипрофен, (+)-N-{4-[3-(4-фторфенокси)фенокси]-2-циклопентен-1-ил}-N-гидроксимочевины салсалат, дифлунизал, ибупрофен, фенопрофен, фенамат, кетопрофен, набуметон, напроксен, диклофенак, индометацин, сулиндак, толметин, этодолак, кеторолак, оксапрозин,

целекоксиб, меклофенамат, мефенамовая кислота, оксифенбутазон, фенилбутазон, салицилаты или средства фитосфингозинового типа.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой противовирусное средство, такое как ацикловир, нелфинавир или
5 виразол.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой антибиотик, включая антибиотики, принадлежащие к семейству
10 пенициллинов, цефалоспоринов, аминогликозидов, макролидов, карбапенемов и пенемов, бета-лактамов, ингибиторов моноциклических бета-лактамов и тетрациклинов, полипептидных антибиотиков, хлорамфеникола и производных, полиэфирных ионофоров и хинолонов. Неограничивающие примеры таких антибиотиков включают ампициллин, дапсон, хлорамфеникол, неомицин, цефаклор, цефадроксил,
15 цефалексин, цефрадин, эритромицин, клиндамицин, линкомицин, амоксициллин, ампициллин, бакампициллин, карбенициллин, диклоксациллин, циклациллин, пиклоксациллин, гетациллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, пенициллин G, пенициллин V, тикарциллин, рифампин, тетрациклин, фузидиевую кислоту, линкомицин, новобиоцин и спектиномицин.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой противомикробное средство, такое как хлорид бензалкония
20 или хлоргексидин.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не включает фармацевтически активное средство, которое представляет собой стероид. Используемый в данном документе термин «стероид»
25 относится к встречающимся в природе стероидам и их производным, а также к синтетическим или полусинтетическим аналогам стероидов, характеризующимся стероидоподобной активностью. Стероид может представлять собой глюкокортикоид или кортикостероид. Примеры конкретных природных и синтетических стероидов
30 включают без ограничения альдостерон, беклометазон, бетаметазон, будесонид,

клопреднол, кортизон, кортивазол, дезоксикортон, десонид, дезоксиметазон, дексаметазон, дифторкортолон, флуклоролон, флуметазон, флунизолид, флуоцинолон, флуоцинонид, флуокортин-бутил, фторкортизон, фторкортолон, фторметолон, флурадренолон, флутиказон, галцинонид, гидрокортизон, икометазон, мепреднизон, метилпреднизолон, параметазон, преднизолон, преднизон, тиксокортол или триамцинолон и их соответствующие фармацевтически приемлемые соли или производные.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фосфолипиды применяют в фармацевтической композиции по настоящему изобретению в качестве единственного активного ингредиента.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтическая композиция практически полностью состоит из неионогенного регулирующего тоничность средства, предусматривающего полиол, и липосом, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления термин «практически полностью состоящая из» относится к композиции, единственным активным ингредиентом которой является указанный активный ингредиент (т. е. липосомы), однако могут быть включены другие соединения, предназначенные для стабилизации, сохранения или контроля осмолярности, вязкости и/или pH состава, но они не обуславливают напрямую терапевтический эффект липосом и/или фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления термин «состоит» относится к композиции, которая содержит липосомы, регулирующее тоничность средство и фармацевтически приемлемую среду-носитель или вспомогательное вещество.

Фармацевтические композиции в соответствии с разными вариантами осуществления настоящего изобретения можно подвергать стерилизации и при необходимости смешивать со вспомогательными средствами, например, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, синтетическими эмульгаторами, дополнительными солями, оказывающими влияние на осмотическое давление, окрашивающими и/или ароматическими веществами и т. п., которые не оказывают вредного действия на липосомы.

GPL, SPL или их комбинации образуют липосомы, предпочтительно липосомы со средним диаметром более приблизительно 0,3 мкм, более приблизительно 0,5 мкм,

более приблизительно 0,8 мкм или более приблизительно 1 мкм. Средний диаметр липосом может составлять менее приблизительно 10 мкм, 8 мкм, 7 мкм, 6 мкм или 5 мкм. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления липосомы характеризуются средним диаметром в диапазоне от приблизительно 0,3 мкм до 10 мкм. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления липосомы характеризуются средним диаметром в диапазоне от приблизительно 0,5 мкм до 9 мкм. В соответствии с еще одними дополнительными вариантами осуществления липосомы характеризуются средним диаметром в диапазоне от приблизительно 1 мкм до 8 мкм. В соответствии с еще одними дополнительными вариантами осуществления липосомы характеризуются средним диаметром в диапазоне от приблизительно 3 мкм до 5 мкм.

Термины «средний диаметр» и «средний размер частиц» используются в данном документе взаимозаменяемо, при этом в некоторых вариантах осуществления они относятся к среднему диаметру липосомы, полученному на основании распределения частиц по размерам, исходя из модели численного распределения. В некоторых вариантах осуществления указанные термины относятся к среднему диаметру липосомы, полученному на основании распределения частиц по размерам, исходя из модели объемного распределения. В дополнительных вариантах осуществления указанные термины относятся к среднему диаметру липосомы, полученному на основании распределения частиц по размерам, исходя из модели распределения площади поверхности. Распределение частиц по размерам можно определять, *среди прочего*, с помощью дифракции лазерного света и/или с помощью счетчика Коултера.

Липосомы могут представлять собой одномембранные или, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, липосомами, могут представлять собой многослойные везикулы (MLV). В соответствии с другими вариантами осуществления липосомы также могут быть липосомами, представляющими собой большие многослойные везикулы (LMVV) или дегидратированные регидратированные везикулы (DRV).

В некоторых вариантах осуществления, предпочтительных в настоящем изобретении, липосомы представляют собой многослойные везикулы (MLV). В таких определенных вариантах осуществления липосомы имеют более одной мембраны.

В соответствии с одним вариантом осуществления MLV определяются по среднему диаметру в диапазоне от 0,3 мкм до 10 мкм. В соответствии с другим вариантом осуществления MLV определяются по среднему диаметру в диапазоне от 0,5 мкм до 9 мкм. В соответствии с другими дополнительными вариантами осуществления MLV определяются по среднему диаметру в диапазоне от приблизительно 1 мкм до 8 мкм. В соответствии с другими дополнительными вариантами осуществления MLV определяются по среднему диаметру в диапазоне от приблизительно 3 мкм до 5 мкм.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит полиол и MLV-липосомы, мембраны которых практически полностью состоят из DMPC и DPPC. Полиол может быть выбран из маннита и глицерина. В дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит маннит и MLV-липосомы, мембраны которых практически полностью состоят из DMPC и DPPC. В дополнительном варианте осуществления концентрация маннита находится в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 70 мг/мл. В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 600 мОсм. В еще одном дополнительном варианте осуществления весовое отношение липосом к манниту находится в диапазоне от приблизительно 6:1 до приблизительно 2:1.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит маннит и MLV-липосомы, мембраны которых практически полностью состоят из DMPC и DPPC. В некоторых вариантах осуществления DMPC присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 20% (вес/вес) до приблизительно 40% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В определенном варианте осуществления DMPC присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 30% (вес/вес). В некоторых вариантах осуществления DPPC присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте,

находящемся в диапазоне от приблизительно 30% (вес/вес) до приблизительно 60% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления DPPC присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 40% (вес/вес). В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 20% (вес/вес) до приблизительно 40% (вес/вес) от сухого веса фармацевтической композиции. В определенном варианте осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 30% (вес/вес).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая маннит и липосомы, мембраны которых практически полностью состоят из DMPC и DPPC, дополнительно содержит гистидиновый буфер в качестве жидкой среды. В дополнительных вариантах осуществления DMPC присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенном варианте осуществления DMPC присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 4% (вес/вес). В некоторых вариантах осуществления DPPC присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 2% (вес/вес) до приблизительно 12% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления DPPC присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 5% (вес/вес). В некоторых вариантах осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции. В определенном варианте осуществления маннит присутствует в фармацевтической композиции с весовым процентом, составляющим приблизительно 4% (вес/вес).

Фармацевтическая композиция в соответствии с разными вариантами осуществления настоящего изобретения может применяться для получения замены

встречающимся в природе PL хряща, а именно в качестве смазывающего вещества и/или средства для снижения изнашивания суставов.

Следует отметить, что температура суставов у пациентов, страдающих сниженным уровнем смазывающей среды сустава или изнашиванием сустава, таким как остеоартрит, меняется по мере развития заболевания [Hollander, J. L.; Moore, R., Studies in osteoarthritis using Intra-Articular Temperature Response to Injection of Hydrocortisone. *Ann. Rheum. Dis.* **1956**, 15, (4), 320–326]. В действительности, данное изменение температуры применялось в качестве клинического инструмента для оценки воспаления при остеоартрите [Thomas, D.; Ansell, B. M.; Smith, D. S.; Isaacs, R. J., Knee Joint Temperature Measurement using a Differential Thermistor Thermometer. *Rheumatology* **1980**, 19, (1), 8–13]. Было показано, что температура в суставах рук у пациентов с остеоартрозом варьирует от ~28 до ~33°C [Varju, G.; Pieper, C. F.; Renner, J. B.; Kraus, V. B., Assessment of hand osteoarthritis: correlation between thermographic and radiographic methods. *Rheumatology* **2004**, 43, 915–919], в то время как температура здорового височно-нижнечелюстного сустава (TMJ) варьирует от ~35 до 37°C [Akerman, S.; Kopp, S., Intra-articular and skin surface temperature of human temporomandibular joint. *Scand. J. Dent. Res.* **1987**, 95, (6), 493–498].

Таким образом, в соответствии с принципами настоящего изобретения требуется и фактически является необходимым условием, чтобы PL или их смесь пребывали в LD фазе, *in situ*, в области сустава, в которой требуется обеспечить смазывающую среду с их помощью. В некоторых вариантах осуществления липосомы характеризуются температурой смещения (верхний предел) перехода из SO в LD фазу, которая не более чем на 15°C превышает температуру *in situ*, т. е. в суставе, в пределах диапазона от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C. В соответствии с принципами настоящего изобретения липосомы образованы из GPL, SPL или их комбинации, а температура перехода из SO в LD фазу, описанная выше, таким образом, касается липосом, которые образованы из GPL, SPL и их комбинаций, таким образом, обеспечивается липосома, в которой PL или их смесь находятся в LD фазе.

В определенных вариантах осуществления неионогенное регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол, не влияет на температуру фазового

перехода у липосом. В дополнительных вариантах осуществления температура фазового перехода у липосом, объединенных с неионогенным регулирующим тоничность средством, предусматривающим полиол, отличается от температуры фазового перехода у липосом отдельно не более чем на приблизительно 10%. В еще
5 одних дополнительных вариантах осуществления температура фазового перехода у липосом, объединенных с неионогенным регулирующим тоничность средством, предусматривающим полиол, отличается от температуры фазового перехода у липосом отдельно не более чем на приблизительно 5%.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять
10 для лечения, облегчения, замедления, предотвращения, ведения или излечения любой патологии сустава или симптомов, возникающих при этом, которая ассоциирована с дисфункцией сустава. Следует считать, что используемый в данном документе термин «патология сустава» означает любое поражение (врожденное, аутоиммунное или иное), повреждение или заболевание области сустава, которые вызывают
15 дегенерацию, боль, снижение подвижности, воспаление, раздражение или физиологическое нарушение и дисфункцию суставов. Патология может быть ассоциирована с уменьшением секреции и обеспечения смазывающей среды сустава, а также с осложнениями, связанными с заменой коленного и тазобедренного сустава.

В соответствии с принципами настоящего изобретения сустав может быть
20 любым из коленного, тазобедренного, голеностопного, плечевого, локтевого, сустава предплюсны, запястного, межфалангового и межпозвонкового. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления указанный сустав представляет собой коленный сустав.

Конкретные патологии суставов включают без ограничения недостатки
25 секреции и/или обеспечения смазывающей среды сустава, возникающие вследствие артрита, включая патологические состояния эрозии сустава при ревматоидном артрите, остеоартрите, остеоартрите у пациентов с ревматоидным артритом, травматическом повреждении сустава (включая спортивную травму),
30 заблокированном суставе (таком как височно-нижнечелюстной сустав (TMJ)), состоянии после артроцентеза, артроскопической операции, операции на открытом

суставе, замене сустава (например, коленного или тазобедренного) у млекопитающих, предпочтительно людей. Предпочтительной патологией, которую следует лечить или предотвращать с помощью применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, является остеоартрит.

5 В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для уменьшения боли в коленном суставе у пациентов с остеоартритом.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять в качестве профилактической меры для предотвращения будущего повреждения или дегенерации. Например, фармацевтическую композицию можно периодически вводить внутрисуставно спортсменам на протяжении всей их карьеры с целью сведения к минимуму риска повреждения, связанного с напряжениями, или дегенерации хряща.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить 15 отдельно или в качестве вспомогательного средства для противовоспалительных средств, болеутоляющих средств, миорелаксантов, антидепрессантов или средств, которые содействуют обеспечению смазывающей среды сустава, обычно применяемые для лечения патологий, ассоциированных со скованностью сустава, таких как артрит. Комбинированный терапевтический подход способствует 20 снижению побочных эффектов, ассоциированных с такими средствами, как нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), обычно применяемые для предотвращения, ведения или лечения патологий, таких как остеоартрит, ассоциированный со снижением обеспечения смазывающей среды сустава. В дополнение к улучшению безопасности комбинированный 25 терапевтический подход также может быть преимущественным в повышении эффективности лечения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представлена в форме, подходящей для парентерального введения. Парентеральное введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению в суставную 30 полость пациента может осуществляться с помощью способа, выбранного из группы, состоящей из внутрисуставной инъекции, артроскопического введения или

хирургического введения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена в форме, подходящей для введения посредством пути введения, выбранного из внутрисуставной инъекции, артроскопического введения или хирургического введения. Одним из полезных признаков раскрытой фармацевтической композиции является присутствие регулирующего тоничность средства, которое доводит осмоляльность липосомальной композиции до физиологического значения, тем самым снижая побочные эффекты, ассоциированные с внутрисуставным введением.

Фармацевтическую композицию в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения можно вводить в дозе от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 10 мл. В дополнительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе от приблизительно 1 мл до приблизительно 6 мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе, составляющей приблизительно 3 мл.

В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 20 мг до приблизительно 350 мг маннита. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 40 мг до приблизительно 250 мг маннита. В определенных вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 120 мг маннита. В другом варианте осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 40 мг маннита. В дополнительном варианте осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 250 мг маннита.

В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 50 мг до приблизительно 1000 мг фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 300 мг фосфолипидов. В другом определенном варианте осуществления одна единица

дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 100 мг фосфолипидов. В дополнительном варианте осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 600 мг фосфолипидов.

5 В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 30 мг до приблизительно 550 мг DPPC. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 50 мг до приблизительно 500 мг DPPC. В определенных вариантах осуществления одна единица дозирования
10 фармацевтической композиции содержит приблизительно 180 мг DPPC. В другом варианте осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 60 мг DPPC. В дополнительном варианте осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 365 мг DPPC.

15 В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 20 мг до приблизительно 450 мг DMPC. В некоторых вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 40 мг до приблизительно 300 мг DMPC. В определенных вариантах осуществления одна единица дозирования
20 фармацевтической композиции содержит приблизительно 140 мг DPPC. В другом варианте осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 45 мг DPPC. В определенных вариантах осуществления одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит приблизительно 275 мг DPPC.

25 Фармацевтическую композицию можно расфасовать во флаконы, или в виде единичных инъекций, или любым другим способом, удобным для практического применения.

Субъекты, для которых предусматривается введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению, включают млекопитающих, таких как без
30 ограничения люди и другие приматы.

На протяжении всего описания и формулы изобретения в данной заявке формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «PL» является ссылкой на один или более PL, а «липосома» относится к одной или нескольким липосомам. На протяжении всего описания и формулы изобретения в данной заявке слова в форме множественного числа также включают ссылки на единственное число, если из контекста явно не следует иное. Следует отметить, что термин «и» или термин «или» обычно используются в его смысле включения «и/или», если из контекста явно не следует иное.

10 При этом на протяжении всего описания и формулы изобретения в данной заявке слова «содержать» и «состоять» и варианты этих слов, например, «содержащий» и «содержит», означают «включающий без ограничения», и не подразумевают исключение (и не исключают) другие фрагменты, добавки, компоненты, целые числа или стадии.

15 Подразумевается, что используемый в данном документе термин «приблизительно», когда он относится к измеряемому значению, такому как количество, отрезок времени и т. п., охватывает вариации, составляющие $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие вариации являются допустимыми при осуществлении раскрытых способов.

25 Следующие примеры представлены с целью более полной иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения. Однако их никоим образом не следует истолковывать как ограничивающие широкий объем настоящего изобретения. Специалист в данной области техники сможет легко разработать множество вариаций и модификаций принципов, раскрытых в данном документе, без отступления от объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы и методы

Материалы

1,2-Димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC 14:0, номер по каталогу 556200), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC 16:0, номер по каталогу 556300) получали от Lipoid (Людвигсхафен, Германия). 1,2-Дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC 18:0, номер по каталогу 850365P), 1,2-дипентадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (C15 (также упоминаемый в данном документе в сокращенной форме как PC (15:0)), номер по каталогу 850350P) получали от Avanti Polar Lipids (Алабастер, Алабама, США). N-пальмитоил-D-эритро-сфингозилфосфорилхолин (пальмитоил сфингомиелин, *D-эритро* C16 (также упоминаемый в данном документе в сокращенной форме как C16 SPM), номер по каталогу 16608050) получали от Bio-Lab ltd. (Иерусалим, Израиль)

Воду высокой чистоты (сопротивление 18,2 мегаОм) получали с применением системы WaterPro PS HPLC/Ultrafilter Hybrid (Labconco, Канзас-Сити, Миссури, США). Этанол степени чистоты для HPLC получали от BioLab Ltd, Иерусалим, Израиль. Все из L-гистидина моногидрохлорида моногидрата, гидроксида натрия (NaOH) и D-маннита получали от Merck (Дармштадт, Германия). Глицерин получали от Merck, № по каталогу 1.04093. Хлорид натрия получали от J. T. Baker, № по каталогу 4058-02

Методы

Приготовление гипотонических композиций, содержащих MLV-липосомы

Смесь требуемых фосфолипидов растворяли в 2,5 мл этанола до концентрации, составляющей 180 мМ. Данный раствор перемешивали на вортексе и помещали на водяную баню (60°C) на ~20 минут. Перемешивание повторяли несколько раз до полного растворения фосфолипидов. Этанольный раствор переносили в 10 мл теплого 10 мМ или 7,5 мМ гистидинового буфера (pH 6,5), энергично перемешивали на вортексе в течение 2 мин для гидратации липидов и образования дисперсии требуемых MLV.

Этанол удаляли с помощью 5 циклов центрифугирования и замены на холодный буфер при 4°C. В случае липосомальных систем, состоящих из РС, центрифугирование проводили при 3000 об/мин в течение 40 минут в 1-м цикле и в течение 30 минут при 4000 об/мин в последующих циклах. В случае липосомальных систем, содержащих SPL, центрифугирование проводили при 4000 об/мин в течение 50 минут дважды с перерывом на протяжении ночи в 1-м цикле и дважды по 40 минут при 4000 об/мин в циклах 2 и 3. Циклы 4 и 5 выполняли в течение 60 мин при 4000 об/мин. Отслеживание удаления этанола выполняли путем измерений осмоляльности. После каждой замены на холодный буфер осадки ресуспендировали с применением стерильной пипетки для разрыхления вязкого осадка, затем пробирки плотно закрывали и перемешивали на вортексе в течение 2 минут. Процесс центрифугирования и замены раствора повторяли до тех пор, пока осмоляльность в смеси не становилась менее 50 мОсм. Измеряли осмотическое давление НВ (10 мМ, 7,5 мМ) и обнаружили, что оно составляло 26 и 19 мОсм соответственно. MLV хранили при 2–8°C до проведения анализа.

Получение изотонических композиций, содержащих MLV-липосомы, и регулирующее тоничность средство

Липосомы получали, как описано в данном документе выше. Этанольный раствор липосом переносили в 10 мл теплого 13,5 мМ гистидинового буфера (pH 6,5), содержащего регулирующее тоничность средство, выбранное из маннита, глицерина и хлорида натрия, и энергично перемешивали на вортексе в течение 2 мин для гидратирования липидов и образования дисперсии требуемых MLV.

Концентрации регулирующих тоничность средств в гистидиновом буфере были следующими: глицерин – 235 мМ; маннит – 234 мМ и NaCl – 131 мМ.

Процесс центрифугирования и замены раствора повторяли до тех пор, пока осмоляльность в смеси не составляла приблизительно 300 мОсм. Композиции хранили при 2–8°C до проведения анализа.

Определение характеристик MLV-липосом

Концентрацию фосфолипидов определяли с применением модифицированного метода Бартлетта [Barenholz, Y. and S. Amselem, *Quality control assays in the*

development and clinical use of liposome-based formulations. Liposome technology, 1993. 1: p. 527–616]. Распределение липосом по размеру определяли с помощью анализатора размера частиц методом лазерной дифракции (LS13320 Beckman Coulter), который позволяет измерять размер частиц в диапазоне от 40 нм до 2 мм. Способ со
5 счетчиком Коултера (который основан на измерении изменений электрической проводимости, по мере того как частицы, суспендированные в проводящей жидкости, проходят через небольшое отверстие) также применяли для определения распределения частиц по размеру.

Ex vivo модель «хрящ-на-хряще» для оценки смазывающей эффективности

10 Нормальный суставной хрящ от доноров (возраст: мужчины 70 лет и женщины 68, 72, 81, 87, 98 лет) получали в ходе оперативных вмешательств при переломах головки бедренной кости в Медицинском центре Хадасса, Иерусалим. Ткань замораживали при -20°C до проведения анализа.

Объединенную синовиальную жидкость от 8 доноров получали в Медицинском
15 центре Хадасса, Иерусалим.

Реагенты, применяемые для получения образцов хряща, включали суперклей (цианоакрилатный клей, 3 г), NaCl (Bio Lab LTD, Израиль, 19030291, номер по каталогу 19030291, № партии 57747) и этанол (Frutarom, Израиль, номер по каталогу 5551640, № партии: 26141007).

20 Образцы получали в лаборатории Заболеваний хряща и суставов, Отделения биомедицинской техники Техниона, ПТ, Хайфа, Израиль. Тесты проводили в трибологических лабораториях Shamban & Microsystems, Отделения биомедицинской техники Техниона, ПТ, Хайфа, Израиль. Внутрिलाбораторный прибор для измерений трения был оснащен тензодатчиком с тензометрической измерительной системой
25 (НВМ Z8, Германия) и программным обеспечением LabView (National Instruments, США).

Прибор собирали следующим образом. Хрящевые цилиндры получали и фиксировали. Из каждого хряща получали по 10–20 цилиндров диаметром 4 мм или 8 мм. Такие цилиндры произвольным образом распределяли в группы обработки
30 различными тестируемыми составами. 8-мм цилиндры устанавливали в прибор на

фиксированный держатель и погружали в раствор, содержащий 2 мл синовиальной жидкости (SF) и тестируемый раствор в соотношении 1:1 (объем/объем). 4-мм цилиндры закрепляли на верхнем поршне.

Измерения. Тест на трение осуществляли с помощью многократных повторений в присутствии различных тестируемых образцов. При каждом измерении верхний цилиндр помещали над нижним цилиндром и после нескольких секунд интервала выдержки измеряли коэффициент трения. Для любой данной пары цилиндров осуществляли не менее 10 независимых измерений, при этом перед каждым последующим тестом цилиндры поворачивали, чтобы обеспечить аналогичные условия во всех повторениях.

Коэффициент трения покоя определяли при специфических трибологических условиях приложенной нагрузки, скорости скольжения, времени выдержки и температуры, как показано в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные условия для модели «хрящ-на-хряще»

Нормальная нагрузка	30 Н
Скорость скольжения	1 мм с ⁻¹
Время выдержки (продолжительность нагрузки перед началом скольжения)	5 с
Расстояние скольжения	5 мм
Температура смазывающего вещества	32–34°C

15

Измерения, проводимые методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC)

Для определения T_m различных липосомальных систем, образцы сканировали с применением MicroCal™ VP-DSC от GE Healthcare Life Sciences (Уппсала, Швеция, в настоящее время в собственности у Malvern UK). Сканирование образцов MLV в НВ и фармацевтической композиции, содержащей липосомы и маннит, при концентрации фосфолипида приблизительно 20 мМ, при этом в эталонной ячейке содержался НВ или НВ с маннитом, выполняли в диапазоне от 10° до 75°C при скорости нагревания, составляющей 1°C/мин. Каждый исследуемый образец сканировали трижды при одинаковой скорости – повышая температуру от 10°C до 75°C (сканограмма 1),

25

понижая температуру от 75°C до 10°C (сканограмма 2) и снова повышая температуру от 10°C до 75°C (сканограмма 3). Обработку калориметрических данных проводили с помощью программного обеспечения Origin® 7.0. T_{on} и T_{off} основного фазового перехода определяли путем экстраполяции прямой линии для определения диапазона температур основного фазового перехода. В случае системы F1 проводили дополнительный анализ с помощью подгонки модели: MN2State вследствие широкого «плеча» в пике 2.

Пример 1. – Эффект регулирующего тоничность средства на смазывающие свойства липосомальной фармацевтической композиции

Обеспечение смазывающей среды для хряща с помощью фармацевтической композиции, содержащей регулирующее тоничность средство и липосому, оценивали с применением *ex vivo* модели «хрящ-на-хряще». *Ex vivo* модель «хрящ-на-хряще» обеспечивает экспериментальную систему для тестирования относительного эффекта препаратов, обеспечивающих биологическое смазывающее вещество, на коэффициент трения покоя. Данный тип измерения может указывать на способность различных смазывающих веществ снижать коэффициент трения хряща. В *ex vivo* модели «хрящ-на-хряще» используется прибор, в котором два закрепленных хрящевых цилиндра могут скользить один над другим, при этом будучи погруженными в растворы различных смазывающих веществ. Прибор позволяет измерять трение покоя между двумя образцами хряща [Merkher Y et al. «A rational human joint friction test using a human cartilage-on-cartilage». Tribology Letters (2006): 29–36]. Данная модель применялась ранее с целью сравнения коэффициента трения различных липосомальных композиций [Sivan S et al. «Liposomes act as effective biolubricants for friction reduction in human synovial joints». Langmuir (2010): 1107-16].

Эксперимент в данном документе разрабатывали для определения относительных смазывающих свойств липосомальных составов, содержащих регулирующее тоничность средство, что видно из измерений коэффициента трения покоя, и для сравнения их со свойствами гипотонического липосомального состава. В таблице 2 представлены фармацевтические композиции, которые тестировали авторы настоящего изобретения. Выбранная липосомальная комбинация представляла собой DMPC/DPPC с отношением мольных процентов, составляющим 45:55.

Таблица 2. Гипотонические и изотонические липосомальные композиции

№ состава	Фосфолипид (отношение мольных процентов)	Регулирующее тоничность средство	Жидкая среда
1	DMPC/DPPC (45:55)	-	Гистидиновый буфер
2	DMPC/DPPC (45:55)	Глицерин	Гистидиновый буфер
3	DMPC/DPPC (45:55)	Маннит	Гистидиновый буфер
4	DMPC/DPPC (45:55)	NaCl	Гистидиновый буфер

Липосомальные композиции содержали 183 мг DPPC и 136 мг DMPC, диспергированных в 3 мл 10 мМ гистидинового буфера (НВ), рН 6,5. Липосомальные композиции, содержащие 10 мМ гистидиновый буфер, характеризовались осмолярностью, составляющей приблизительно 50 мОсм (таблица 3). Соответственно, чтобы повысить осмолярность до уровня изотоничности, составляющего приблизительно 300 мОсм, концентрация регулирующего тоничность средства должна быть доведена для обеспечения приблизительно 250 мМ растворенного компонента.

Маннит добавляли в количестве 120 мг (4 вес. % или 40 мг/мл) с образованием изотонической композиции. Глицерин добавляли в количестве 61 мг (2 вес. % или 20 мг/мл). Хлорид натрия добавляли в количестве 21 мг.

В таблице 3 обобщены физико-химические свойства различных липосомальных композиций. Липосомальные композиции получали с помощью трех различных регулирующих тоничность средств, при этом каждое вносило равный вклад в общую осмолярность препарата. Изотоничность таких препаратов составляла приблизительно 300 мОсм. Выполняли сравнение между ионогенными (NaCl) и неионогенными (маннит и глицерин) регулируемыми тоничность средствами. Также тестировали гипотоническую липосомальную композицию без регулирующего тоничность средства (менее 50 мОсм). Эффект регулирующего тоничность средства на смазывающую способность липосомальной композиции оценивали с применением

установки с моделью «хрящ-на-хряще», которая описана в разделе *Материалы и методы*.

Таблица 3. Физико-химические свойства липосомальных композиций.

	Буфер	Изотонические составы		
		Маннит	Глицерин	NaCl
pH	6,6	6,4	6,4	6,4
Осмоляльность (мОсм)	49	307	299	289
Размер частиц по объему (мкм)	5,8	4,4	3,8	4,5
Размер частиц по площади поверхности (мкм)	3,4	2,8	2,9	3,2
Размер частиц по числу (мкм)	1,3	1,5	1,7	1,8
Анализ DMPC (мМ)	66,4	67,5	70,2	69,6
Анализ DPPC (мМ)	81,7	82,1	84,7	83,3
Концентрация фосфолипида (мМ)	148	150	155	153
Отношение мольных процентов DMPC/DPPC	55,2/44,8	45,1/54,9	45,3/54,7	45,5/54,5
Лизо-миристоилфосфатидилхолин (%)	NMT* 0,5	ND**	ND	ND
Лизо-пальмитоилфосфатидилхолин (%)	NMT 0,5	ND	ND	ND
Миристиновая кислота (%)	0,27	ND	ND	ND
Пальмитиновая кислота (%)	0,27	0,06	0,04	ND
Суммарное содержание примесей	LT*** 0,2	0,06	0,04	ND

*NMT — не более

**ND — не обнаружено

***LT — менее

5

10

В таблице 4 представлены предварительные результаты средних коэффициентов трения покоя, полученные в эксперименте. Точность повторений измерений является подобной для всех протестированных составов, что отражается в относительном SD.

Таблица 4. Смазывающие свойства липосомальных композиций.

Состав	Буфер	Глицерин	Маннит	NaCl
Количество повторений	53	55	56	50
Ср. коэффициент трения покоя	0,093	0,075	0,064	0,098
S.D.	0,025	0,020	0,022	0,026

Сравнение составов показало, что препарат, содержащий маннит, проявлял самый низкий коэффициент трения покоя по сравнению с другими изотоническими 5 составами. Самое низкое значение коэффициента трения покоя указывает на то, что состав с маннитом обладает более выраженными смазывающими свойствами. Неожиданно обнаружили, что коэффициент трения покоя, полученный с применением состава с маннитом, был на приблизительно 30% ниже такового в случае применения гипотонической липосомальной композиции без регулирующего 10 тоничность средства. Состав с глицерином также обеспечивал лучшую смазывающую среду (средний коэффициент трения покоя был на приблизительно 20% ниже такового при сравнении с гипотоническим составом). Напротив, добавление ионогенного регулирующего тоничность средства в липосомальную композицию не улучшало его смазывающую способность.

15 Пример 2. – Эффект регулирующего тоничность средства на термотропные свойства липосомальных фармацевтических композиций

Эксперимент в данном документе разрабатывали для определения того, влияет ли добавление регулирующего тоничность средства на термотропное поведение и термодинамические параметры липосомальной композиции, в том числе на диапазон 20 фазового перехода SO-LD ($T_{on} \rightarrow T_{off}$), T_p , T_m , $T_{1/2}$ и ΔH . T_{on} и T_{off} представляют температуру, при которой на сканограммах нагревания начинался и заканчивался фазовый переход SO-LD, T_p и T_m представляют температуру, при которой происходит максимальное изменение теплоемкости в момент, предшествующий фазовому переходу (T_p), и в момент основного фазового перехода (T_m), $T_{1/2}$ 25 представляет собой диапазон (ширину) температур на половине высоты эндотермы, представляющий изменение энтальпии во время фазового перехода SO-LD, а ΔH

представляет собой площадь под кривой, представляющей общее изменение энтальпии во время фазового перехода SO-LD.

Выбирали два типа липосомальных композиций, каждую из которых тестировали с маннитом и без него (в качестве регулирующего тоничность средства).

5 Тестируемые липосомальные композиции представлены в таблице 5.

Таблица 5. Гипотонические и изотонические липосомальные композиции

Фосфолипид (отношение мольных процентов (где применимо))	Регулирующее тоничность средство	Жидкая среда
DMPC/DPPC (45:55)	-	Гистидиновый буфер
DMPC/DPPC (45:55)	Маннит	Гистидиновый буфер
1,2-дипентадеканойл- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин (C15)	-	Гистидиновый буфер
1,2-дипентадеканойл- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин (C15)	Маннит	Гистидиновый буфер

Липосомальные композиции с DMPC/DPPC содержали 183 мг DPPC и 136 мг DMPC, диспергированных в 3 мл 10 мМ гистидинового буфера (НВ), pH 6,5.

10 Липосомальная композиция с C15 содержала 212 мг (70,6 мг/мл) фосфолипида. Маннит добавляли в количестве 120 мг (4 вес. %) с образованием изотонических композиций.

В таблице 6 обобщены физико-химические свойства различных липосомальных композиций.

15 Таблица 6. Физико-химические свойства липосомальных композиций.

Фосфолипид	Регулирующее тоничность средство	Общая концентрация PC (мМ)	Осмоляльность MLV (мОсм)	Объемное распределение по размеру		
				Ср. значение (мкм)	Медиана (мкм)	S.D.
DMPC/DPPC	-	105	34	2,7	2,18	1,73
DMPC/DPPC	маннит	91	288	4,24	2,70	4,61
C15	-	102,7	28	3,97	2,59	3,96
C15	маннит	99,3	272	3,1	2,61	1,96

Для определения термотропного поведения и термодинамических параметров ($T_{on} \rightarrow T_{off}$, T_m , $T_{1/2}$, ΔH) различных систем образцы сканировали с применением MicroCal™ VP-DSC (GE Healthcare Life Sciences, Уппсала, Швеция). Обработку калориметрических данных проводили с помощью программного обеспечения Origin® 7.0. Способ, с помощью которого определяли диапазон $T_{on} \rightarrow T_{off}$, описан в разделе *Материалы и методы*.

В таблице 7 представлена термотропные характеристики тестируемых липосомальных композиций, оцениваемые на основании сканограмм DSC

Таблица 7. Термотропные характеристики липосомальных композиций.

Фосфолипид	Регулирующее тоничность средство	Термотропные характеристики									
		Пик 1 (момент, предшествующий фазовому переходу)					Пик 2 (фазовый переход)				
		T_{on} (°C)	T_{off} (°C)	T_p (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	ΔH (кал/моль)	T_{on} (°C)	T_{off} (°C)	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	ΔH (кал/моль)
DMPC/DPPC	-	17,8	24,7	21,0	2,2	1030,5	30,44	35,19	33,6	3,5	9782,1
DMPC/DPPC	маннит	17,6	24,5	21,0	2,5	962,7	30,49	35,42	33,7	3,3	10707,7
C15	-	21,7	27,3	24,6	2,2	1316,9	33,03	35,16	34,3	1,3	6716,9
C15	маннит	20,5	27,0	24,5	2,5	1009,1	32,66	35,29	34,4	1,5	6081,3

10

Результаты, обобщенные в таблице 7 и на фигурах 1 и 2, указывают на отсутствие эффекта маннита на термотропное поведение MLV, содержащих DMPC/DPPC с мольным отношением 45/55, и MLV, содержащих 100 моль % C15.

Пример 3. – Температуры фазового перехода липосомальных комбинаций

15

Настоящее исследование выполняли с возможностью оценки термотропного поведения и термодинамических параметров разных липосомальных композиций и, в частности, для нахождения липосомальных комбинаций, характеризующихся температурой фазового перехода в диапазоне от 20°C до 39°C. Поскольку добавление маннита не влияет на термотропное поведение липосом (как было показано в примере 2), температуры фазового перехода разных липосомальных композиций, тестируемых в исследовании данного документа, должны быть аналогичны температурам соответствующих изотонических композиций.

20

Тестируемые липосомальные композиции представлены в таблице 8.

Таблица 8. Липосомальные композиции

Система	Фосфолипид (моль %)					Буфер	Ожидаемая T _m
	DMPC	DPPC	DSPC	C15	D-эритро C16		
A1	0	100	-	-	-	HB	41°C
B1	10	90	-	-	-	HB	<41°C
C1	25	75	-	-	-	HB	<<41°C
D1	45	55	-	-	-	HB	~34°C
F1	75	-	25	-	-	HB	<<55°C
G1	45	-	-	55	-	HB	<<35°C
H1	25	-	-	75	-	HB	<35°C
A2	-	-	-	-	100	HB	~41°C
B2	10	-	-	-	90	HB	<41°C
C2	25	-	-	-	75	HB	<41°C
D2	75	-	-	-	25	HB	<<41°C
E2	90	-	-	-	10	HB	<<41°C
F2	100	-	-	-	-	HB	~24°C
G2	-	-	-	100	-	HB	~34°C

5 Определяли характеристики различных систем MLV с точки зрения распределения по размеру, осмоляльности и общей концентрации PC. Результаты приведены в таблицах 9-12.

Таблица 9. Физико-химические свойства MLV из различных смесей DPPC: DMPC

Отношение PC в системе (моль %)	Общая концентрация PC (мМ)	Осмоляльность MLV (мОсм)	Объемное распределение по размеру		
			Ср. значение (мкм)	Медиана (мкм)	S.D.
A1 DPPC 100	93	31	3,12	2,4	2,38
B1 DMPC/DPPC 10/90	111	29	3,10	2,34	2,31
C1 DMPC/ 25/75	107	27	3,92	2,64	4,03
D1 DMPC/DPPC 45/55	105	34	2,7	2,18	1,73
F2 DMPC 100	136,5	32	2,93	1,87	3,02

Исходя из результатов измерения осмоляльности, описанных в данной таблице, во всех системах MLV уровень этанола составляет менее 0,1%. Исходя из коэффициента распределения липосома/вода, его большая часть находится в водной фазе.

5 Таблица 10. Физико-химические свойства MLV, состоящих из смеси DSPC: DMPC

Отношение PC в системе (моль %)	Общая концентрация PC (мМ)	Осмоляльность MLV (мОсм)	Объемное распределение по размеру		
			Ср. значение (мкм)	Медиана (мкм)	S.D.
F1 DMPC/DSPC 75/25	69	50	3,72	3	2,77

Исходя из результатов измерения осмоляльности, описанных в данной таблице, уровень этанола составляет менее 0,2%. Исходя из коэффициента распределения липосома/вода, его большая часть находится в водной фазе. У данных MLV наблюдается большая потеря липидов, которая произошла во время удаления этанола.

10 Таблица 11. Физико-химический свойства MLV, состоящих из различных смесей C15:DMPC

Отношение PC в системе (моль %)	Общая концентрация PC (мМ)	Осмоляльность MLV (мОсм)	Объемное распределение по размеру		
			Ср. значение (мкм)	Медиана (мкм)	S.D.
G2 PC(15:0) 100	102,7	28	3,97	2,59	3,96
G1 DMPC/PC15 45/55	103	40	4,57	3,44	3,84
H1 DMPC/PC15 25/75	97	34	3,06	2,16	2,38

15 Исходя из результатов измерения осмоляльности, описанных в данной таблице, во всех системах MLV уровень этанола составляет менее 0,1%. Исходя из

коэффициента распределения липосома/вода, его большая часть находится в водной фазе.

Таблица 12. Физико-химические свойства MLV, состоящих из различных смесей DMPC/D-эритро C16

Отношение PC в системе (моль %)	Общая концентрация PC (мМ)	Осмоляльность MLV (мОсм)	Объемное распределение по размеру		
			Ср. значение (мкм)	Медиана (мкм)	S.D.
A2 D-эритро C16 100	53,9	20	4,04	2,66	4,38
B2 DMPC/D-эритро C16 10/90	76,6	20	3,31	2,27	3,25
C2 DMPC/D-эритро C16 25/75	85,7	21	3,37	2,31	3,18
D2 DMPC/C16 D-эритро C16 75/25	90,4	24	2,67	2,05	1,83
E2 DMPC/ D-эритро C16 10/90	56,6	22	3,7	3,03	2,5
F2 DMPC 100	136,5	32	2,93	1,87	3,02

5

Исходя из результатов измерения осмоляльности, описанных в данной таблице, во всех системах MLV уровень этанола составляет менее 0,1%. Исходя из коэффициента распределения липосома/вода, его большая часть находится в водной фазе.

10 Термотропное поведение и термодинамические параметры липосомальных комбинаций оценивали, как описано в примере 2 и в разделе *Материалы и методы*. В таблице 13 обобщены результаты исследования термотропных характеристик тестируемых липосомальных комбинаций, а на фигуре 3 показан диапазон температур фазового перехода SO-LD у MLV, состоящих из различных смесей

15 фосфолипидов, который оценивали на основании сканограмм DSC.

Таблица 13. Термотропные характеристики MLV, состоящих из различных смесей, которые оценивали на основании сканограмм DSC

Отношение PC (моль %)	Термотропные характеристики									
	Пик 1 (момент, предшествующий фазовому переходу)					Пик 2 (фазовый переход)				
	T _{on} (°C)	T _{off} (°C)	T _p (°C)	T _{1/2} (°C)	ΔH (кал/моль)	T _{on} (°C)	T _{off} (°C)	T _m (°C)	T _{1/2} (°C)	ΔH (кал/моль)
Смеси DPPC: DMPC										
DPPC (100)	32,3	37,3	34,9	2,2	1983,5	40,44	42,45	41,8	1,3	7993,7
DMPC/DPPC (10/90)	28,3	33,8	30,8	2,9	1666,2	37,77	40,91	40,0	1,9	9982,4
DMPC/DPPC (25/75)	22,6	29,8	25,8	3,2	1429,3	34,24	38,23	37,4	2,8	10363,0
DMPC/DPPC (45/55)	17,8	24,7	21,0	2,2	1030,5	30,44	35,19	33,6	3,5	9782,1
DMPC (100)	11,4	16,4	14,0	1,0	683,7	23,24	25,24	24,4	1,1	5394,7
Смесь DSPC: DMPC										
DMPC/DSPC (75/25)	11,4	17,4	14,2	4,0	369,5	24,67	34,6	27,1	2,7	10199, 9
Смеси C15: DMPC										
C15 (100)	21,7	27,3	24,6	2,2	1316,9	33,03	35,16	34,3	1,3	6716,9
DMPC/C15 (45/55)	15,9	21,0	18,1	1,7	1059,7	28,03	30,28	29,4	1,3	7767,7
DMPC/C15 (25/75)	17,9	22,9	20,4	1,2	851,1	30,35	32,12	31,3	1,2	7107,5
Смеси D-эритро C16/DMPC										
SPM (100)	30,2	38,8	33,9	0,8	941,5	41,14	43,24	41,8	1,0	7967,0
D-эритро C16/DMPC (90/10)	32,5	36,0	33,8	0,7	200,2	38,36	41,91	39,7	2,2	7503,7
D-эритро C16/DMPC (75/25)	22,3	25,8	23,8	0,5	97,5	34,7	39,77	36,5	3,1	6758,1
D-эритро C16/DMPC (25/75)	13,9	19,1	16,6	2,9	126,9	30,91	36,19	32,1	3,2	7304,5
D-эритро C16/DMPC (10/90)	11,4	14,8	13,0	1,3	233,9	26,68	29,72	27,5	1,7	7592,0
DMPC (100)	11,4	16,4	14,0	1,0	683,7	23,24	25,24	24,4	1,1	5394,7

Можно видеть, что различные липосомальные комбинации, включая, например, DMPC/DPPC (25/75), DMPC/DPPC (45/55), DMPC/DSPC (75/25), DMPC/C15 (45/55), DMPC/C15 (25/75), D-эритро C16/DMPC (75/25), D-эритро C16//DMPC (25/75) и D-эритро C16/DMPC (10/90) характеризуются температурой фазового перехода мембраны липосом в требуемом диапазоне температур от 20°C до 39°C.

Пример 4. – Оценка липосомальной композиции с помощью штифтодискового теста на истирание хряща

Трибологические условия в колене искусственно воспроизводили *in vitro* с помощью штифтодискового теста с применением штифтов из хрящей свиньи, скользящих по дискам CoCrMo. Штифтодисковые тесты на истирание хряща проводили на устройстве OrthoPOD от Advanced Mechanical Technology Inc. (AMTI), Вотертаун, Массачусетс 02472-4800, США. Устройство нагревали в термостате для обеспечения температуры 37±3°C внутри жидкости. Цилиндрические контейнеры заполняли 20 мл тестируемой жидкости. Силы, прилагаемые каждым индивидуальным прижимным рычагом, проверяли с помощью штифта, центрированного над диском при 3, 10, 30, 50 и 100 Н с применением датчика силы Мекмезина.

Хрящевые штифты извлекали из плечевых суставов свиней. Суставную капсулу вскрывали скальпелем, чтобы обнажить поверхность хряща. С помощью полого пробойника с внутренним диаметром 5,0 мм собирали по меньшей мере десять цилиндрических штифтов. Для каждого штифтодискового теста на истирание выбирали шесть штифтов, полученных от одного и того же животного, с соответствующей длиной и наименьшим наклоном поверхности.

Смазывающую способность фармацевтической композиции по настоящему изобретению оценивали путем измерения потери массы субхондральной кости и потери высоты после 12 часов теста на изнашивание. Для каждого теста использовали шесть хрящевых штифтов, при этом три штифта удаляли после 6 часов, а остальные три штифта тестировали в течение дополнительных 6 часов. Кроме определения веса и потери массы штифтов, поверхности хряща анализировали с помощью оптического прибора для определения профиля до и после испытания. Используемым устройством был конфокальный микроскоп для интерферометрии S neox (Sensofar, Испания). Для

определения параметров шероховатости после удаления формы из топографий получали более 12 линейных профилей. Для иллюстрации наклонного положения поверхности профили получали на основании 5X конфокальных измерений в направлении север-юг, поскольку расположение штифтов было таким, что их наивысший уровень был обращен к югу. Для большей четкости эти профили сглаживали и смещали с применением программы Kaleidagraph 4.0.

Композицию на основе липосом, содержащую маннит (состав № 3 из таблицы 2), тестировали в тесте на изнашивание. Данную композицию сравнивали с белоксодержащей жидкостью, содержащей 30 г/л белков сыворотки теленка, EDTA и NaN_3 , применяемую в тесте с симулятором тазобедренного сустава (ISO 14242-1).

Результаты

Тест на изнашивание

В штифтодисковых тестах, проводимых в белоксодержащей жидкости, показано изнашивание хрящей. Средняя потеря массы штифтов возрастала от 22 мг после 6 часов до 26 мг после 12 часов тестирования. Возрастание средней потери высоты штифтов было более выраженным и составляло 0,6 мм после 6 часов и 1,1 мм после 12 часов изнашивания. Полученные профили (фигура 4) показывают, что после 6 часов изнашивания поверхности хряща были уплощенными. Часть хрящевого материала была отодвинута в сторону и образовала наружную выпуклость, которая была слабо прикреплена к исходному штифту. Таким образом, фактическая потеря массы была недооценена, поскольку вес определяли с включением прикрепленной выпуклости. После 12 часов изнашивания на трех оставшихся штифтах были видны участки, где хрящ был перетертым и где появилась субхондральная кость (фигура 4 и фигуры 5A, 5B).

У хрящевых штифтов в липосомальной композиции (состав № 3) после извлечения наблюдали признаки истирания. Средняя потеря массы штифтов составляла 14 мг после 6 часов изнашивания и оставалась на этом уровне в течение дополнительных 6 часов изнашивания. Потеря высоты составляла от 0,3 до 0,4 мм для этих двух моментов времени. После 6 часов изнашивания поверхности хряща были уплощенными (фигура 6 и фигуры 7A, 7B), и материал хряща образовывал

выпуклость вокруг центра. После 12 часов изнашивания поверхности хряща оставшихся штифтов все еще были неповрежденными и на них не было областей с появлением субхондральной кости (фигуры 8А, 8В).

Для хрящевых штифты в белковой жидкости показано появление субхондральной кости после 12 часов теста на изнашивание, в отличие от штифтов в липосомальной композиции, где хрящ оставался неповрежденным на протяжении всего теста. По-видимому, в липосомальной композиции изнашивание замедлялось, поскольку в интервале от 6 до 12 часов дополнительной потери массы или потери высоты не наблюдали.

Результаты теста на изнашивание дополнительно проиллюстрированы на фигурах 9А (потеря массы) и 9В (потеря высоты). Сравнение двух жидкостей показало, что применение липосомальной композиции приводило к меньшей потере массы и высоты у хрящевых штифтов.

Измерения шероховатости

Параметры шероховатости определяли на основании серии полученных профилей, исходя из интерферометрических измерений с помощью 10X объектива D1. Измерения проводили в центральной части штифта, точно в пределах поверхности контакта. На фигурах 10А и 10В показаны иллюстративные профили после удаления формы подстилающей плоскости.

Выбранные параметры шероховатости R_a , R_k , R_{pk} и R_{vk} показаны на фигуре 11. В случае тестов на изнашивание в жидкости на основе белка можно было наблюдать высокосignificant повышение этих параметров вследствие изнашивания ($p < 0,01$). Например, средняя шероховатость R_a возрастала от $0,5 \pm 0,2$ мкм в момент $t = 0$ до $1,6 \pm 0,4$ мкм в случае подвергнутых изнашиванию штифтов, а базовая шероховатость R_k возрастала от $1,4 \pm 0,5$ мкм до $4,5 \pm 1,1$ мкм. В случае теста на изнашивание в липосомальной композиции наблюдалось более маленькое, но значимое увеличение параметров шероховатости за исключением R_{pk} ($p > 0,2$). Средняя шероховатость R_a возрастала от $0,4 \pm 0,2$ мкм до $0,8 \pm 0,3$ мкм, а базовая шероховатость R_k возрастала от $0,9 \pm 0,4$ мкм до $2,4 \pm 0,8$ мкм.

5 Специалисты в данной области будут понимать, что настоящее изобретение не ограничивается тем, что было конкретно показано и описано в данном документе выше. Вместо этого, объем настоящего изобретения включает как комбинации, так и подкомбинации различных признаков, описанных в данном документе выше, а также их вариации и модификации. Следовательно, настоящее изобретение не следует считать ограниченным конкретно описанными вариантами осуществления, и объем и замысел настоящего изобретения будет легче понять со ссылкой на формулу изобретения, которая следует ниже.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:

неионогенное регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и

5 липосомы, содержащие по меньшей мере одну мембрану, содержащую по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C₁₂–C₁₈-углеводородные цепи, которые могут быть идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C₁₂–C₁₈-углеводородную цепь, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется
10 температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C;

где фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства,

15 причем фармацевтическая композиция предназначена для применения в обеспечении смазывающей среды сустава млекопитающего, характеризующегося температурой, которая превышает температуру фазового перехода.

2. Композиция по п. 1, где полиол выбран из маннита и глицерина.

3. Композиция по п. 2, где регулирующее тоничность средство предусматривает маннит.

20 4. Композиция по любому из пп. 1–3, дополнительно содержащая жидкую среду, в которой суспендированы липосомы.

5. Композиция по п. 4, где указанная жидкая среда выбрана из буфера и воды.

25 6. Композиция по п. 5, где указанный буфер выбран из гистидинового буфера и забуференного фосфатом солевого раствора.

7. Композиция по любому из пп. 1–6, где полиол присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,05% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес).

8. Композиция по п. 7, где маннит присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес).
9. Композиция по п. 7, где глицерин присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,05 до приблизительно 5% (вес/вес).
10. Композиция по любому из пп. 1–9, которая характеризуется осмоляльностью в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 600 мОсм.
11. Композиция по п. 10, которая характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно 300 мОсм.
12. Композиция по любому из пп. 1–11, рН которой составляет приблизительно 5–8.
13. Композиция по любому из пп. 2–13, где весовое отношение липосом к манниту находится в диапазоне от приблизительно 6:1 до приблизительно 2:1.
14. Композиция по любому из пп. 1–13, где указанные липосомы представляют собой многослойные везикулы (MLV).
15. Композиция по любому из пп. 1–14, где указанный GPL содержит две C₁₄-, C₁₅-, C₁₆- или C₁₈-ацильные цепи.
16. Композиция по любому из пп. 1–15, где по меньшей мере одна из указанных углеводородных цепей является насыщенным углеводородной цепью.
17. Композиция по п. 16, где две углеводородные цепи являются насыщенными.
18. Композиция по любому из пп. 1–17, где указанный PL представляет собой фосфатидилхолин (PC).
19. Композиция по п. 18, где указанная по меньшей мере одна мембрана содержит 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DMPC).
20. Композиция по п. 19, где указанная по меньшей мере одна мембрана дополнительно содержит PC, выбранный из группы, состоящей из 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-дипентадеканойл-*sn*-глицеро-3-фосфохолина

(C15), 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), и SM, имеющий C₁₆-углеводородную цепь (D-эритро C16).

21. Композиция по п. 20, где мольный процент DMPC в по меньшей мере одной мембране находится в диапазоне от приблизительно 10% до приблизительно 75%.

22. Композиция по п. 20, где указанная по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и DPPC.

23. Композиция по п. 22, где отношение мольных процентов DMPC к DPPC находится в диапазоне от приблизительно 25:75 до приблизительно 70:30.

24. Композиция по п. 23, где отношение мольных процентов DMPC к DPPC составляет приблизительно 45:55.

25. Композиция по п. 20, где указанная по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и C15.

26. Композиция по п. 25, где отношение мольных процентов DMPC к C15 находится в диапазоне от приблизительно 25:75 до приблизительно 45:55.

27. Композиция по п. 20, где указанная по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и DSPC.

28. Композиция по п. 27, где отношение мольных процентов DMPC к DSPC составляет приблизительно 75:25.

29. Композиция по п. 20, где указанная по меньшей мере одна мембрана содержит DMPC и D-эритро C16.

30. Композиция по п. 29, где отношение мольных процентов DMPC к D-эритро C16 находится в диапазоне от приблизительно 10:90 до приблизительно 25:75.

31. Композиция по п. 18, где указанная по меньшей мере одна мембрана содержит C15.

32. Композиция по любому из пп. 1–31, где общая концентрация PL находится в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно 300 мМ.

33. Композиция по любому из пп. 1–32, где фосфолипиды присутствуют в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,5% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции.

5 34. Композиция по любому из пп. 1–33, где липосомы характеризуются средним диаметром, составляющим от приблизительно 0,5 мкм до приблизительно 10 мкм.

10 35. Композиция по любому из пп. 1–34, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода, составляющей от приблизительно 30°C до приблизительно 35°C.

36. Композиция по любому из пп. 1–35, где температура сустава находится в диапазоне температур, которые на приблизительно 1–15°C превышают указанную температуру фазового перехода.

15 37. Композиция по любому из пп. 1–36, которая практически не содержит гиалуроновую кислоту.

38. Композиция по п. 1, содержащая MLV-липосомы, мембраны которых практически полностью состоят из DMPC и DPPC; маннит и гистидиновый буфер, где DMPC присутствует в фармацевтической композиции при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 10% (вес/вес), DPPC присутствует при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 2% (вес/вес) до приблизительно 12% (вес/вес), и маннит присутствует при весовом проценте, находящемся в диапазоне от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 7% (вес/вес) от общего веса фармацевтической композиции.

25 39. Композиция по любому из пп. 1–38, где одна единица дозирования фармацевтической композиции содержит от приблизительно 20 мг до приблизительно 350 мг маннита и от приблизительно 50 мг до приблизительно 1000 мг фосфолипидов.

40. Композиция по любому из пп. 1–39, которая представлена в форме фармацевтической композиции для парентерального введения, содержащей суспензию липосом.

41. Композиция по любому из пп. 1–40, где композиция представлена в форме, подходящей для введения, выбранного из группы, состоящей из внутрисуставной инъекции, артроскопического введения и хирургического введения.

42. Композиция по любому из пп. 1–41, где обеспечение смазывающей среды предназначено для лечения, ведения или предотвращения патологии или патологического состояния сустава или симптомов, возникающих при этом.

43. Композиция по п. 42, где указанная патология или патологическое состояние сустава выбраны из группы, состоящей из артрита, остеоартрита, остеоартрита у пациентов с ревматоидным артритом, травматического повреждения сустава, заблокированного сустава, спортивной травмы, травматического повреждения, приводящего к остеоартриту (ОА), сустава после артроцентеза, артроскопической операции, операции на открытом суставе, замены сустава и псориатического артрита.

44. Композиция по любому из пп. 1–43, предназначенная для уменьшения боли в коленном суставе у пациентов с остеоартритом.

45. Композиция по любому из пп. 1–41, где обеспечение смазывающей среды предназначено для предотвращения изнашивания сустава.

46. Способ обеспечения смазывающей среды сустава млекопитающего, причем способ включает введение в полость сустава фармацевтической композиции, содержащей:

неионогенное регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и

липосомы, практически полностью состоящие из по меньшей мере одной мембраны, содержащей по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C12–C18-углеводородные цепи, которые являются идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C12–C18-углеводородную цепь, где по меньшей

мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C;

при этом фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства,

5 где сустав характеризуется температурой сустава, которая превышает температуру фазового перехода.

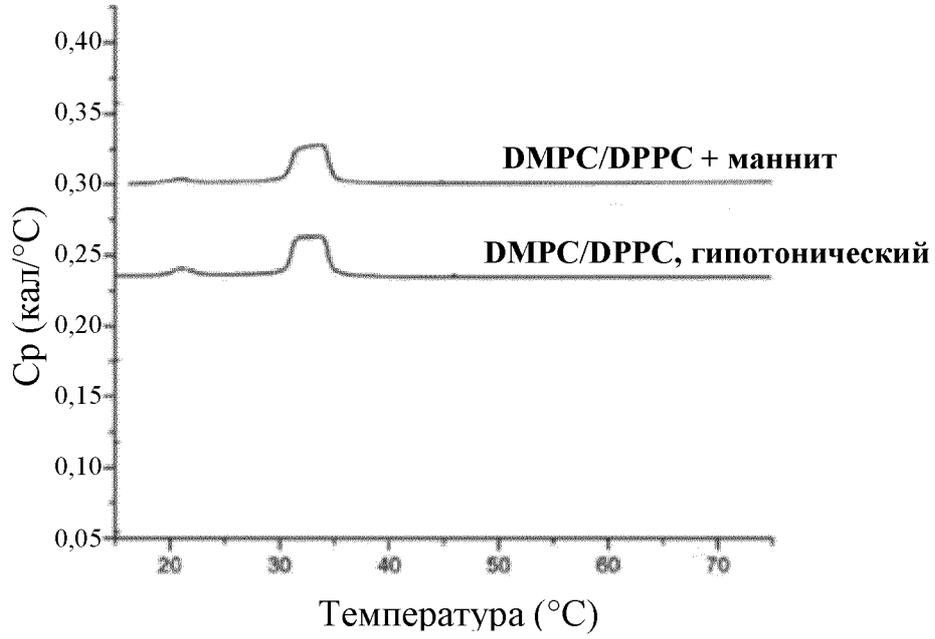
47. Способ лечения боли или раздражения сустава у субъекта с патологией сустава, причем способ включает обеспечение смазывающей среды сустава указанного субъекта путем введения в полость сустава фармацевтической
10 композиции, содержащей:

неионогенное регулирующее тоничность средство, предусматривающее полиол; и

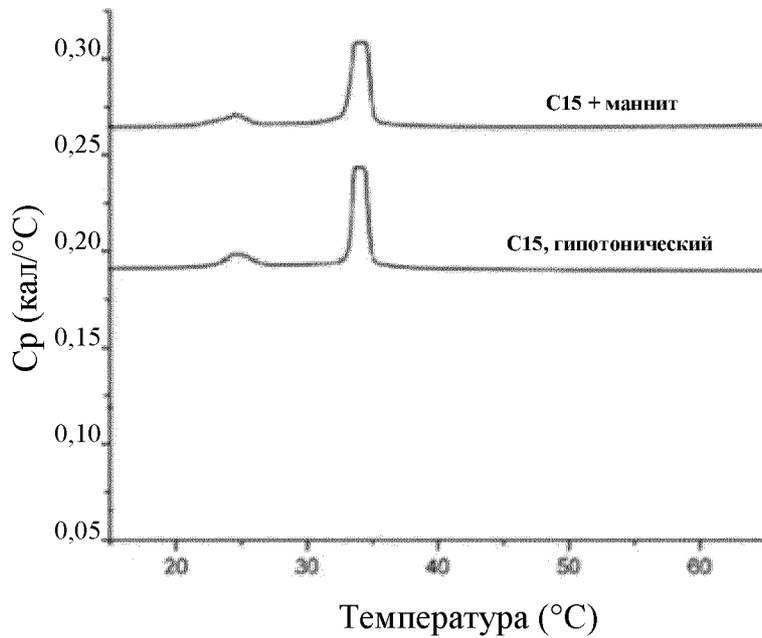
липосомы, практически полностью состоящие из по меньшей мере одной мембраны, содержащей по меньшей мере один фосфолипид (PL), выбранный из
15 глицерофосфолипида (GPL), причем указанный GPL имеет две C12–C18-углеводородные цепи, которые являются идентичными или различными, и сфингомиелина (SM), имеющего C12–C18-углеводородную цепь, где по меньшей мере одна мембрана характеризуется температурой фазового перехода в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 39°C;

20 при этом фармацевтическая композиция практически не содержит дополнительного фармацевтически активного средства,

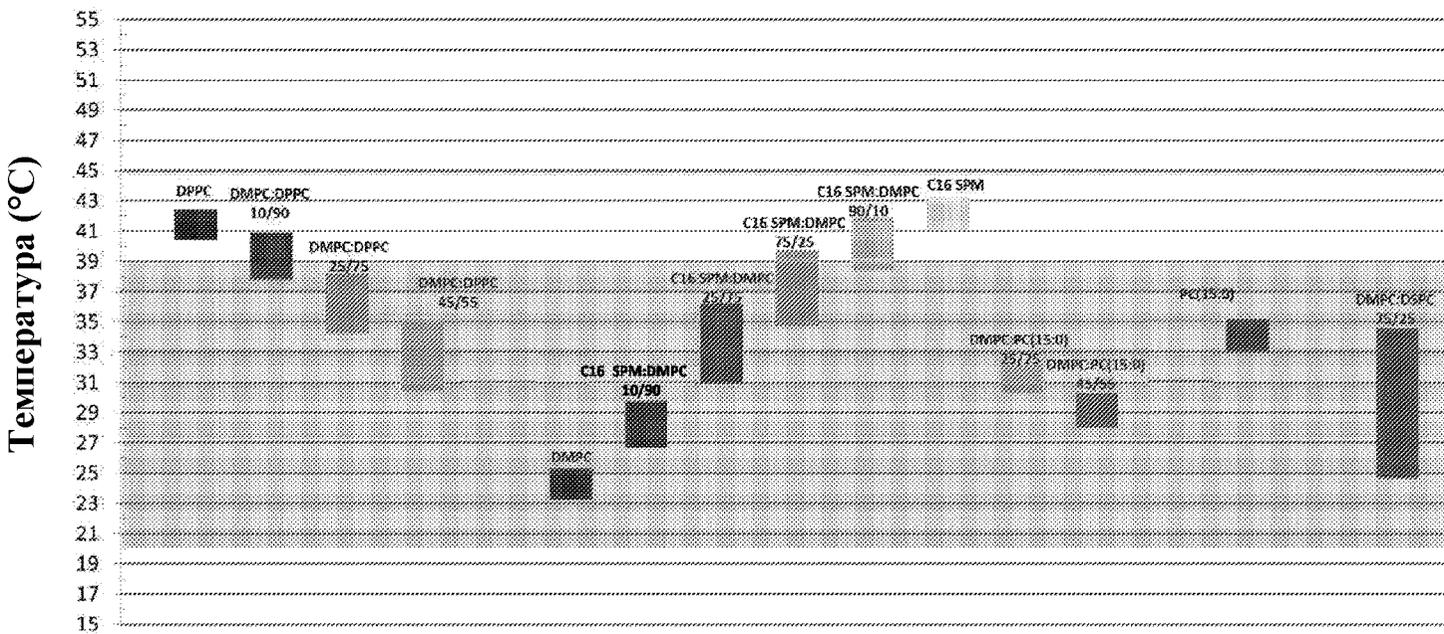
где сустав характеризуется температурой сустава, которая превышает температуру фазового перехода.



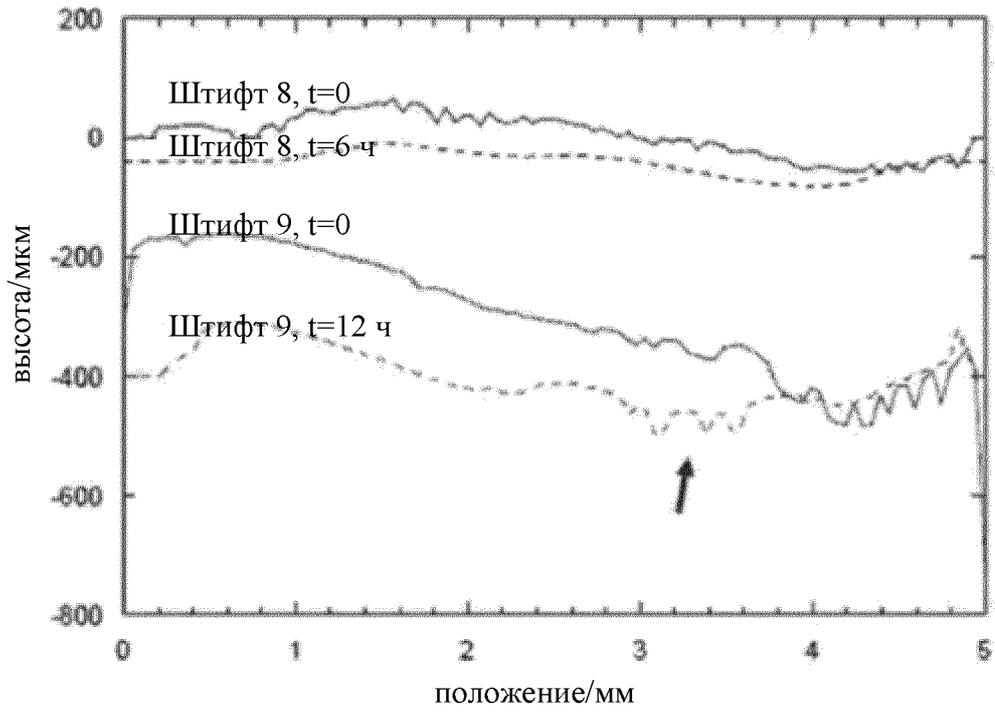
ФИГУРА 1



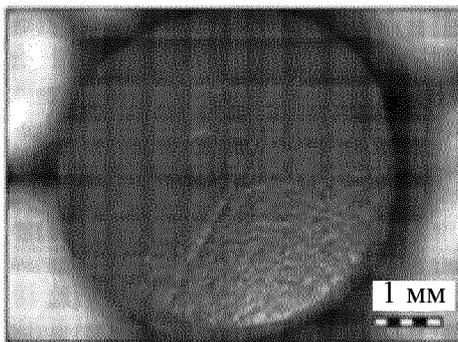
ФИГУРА 2



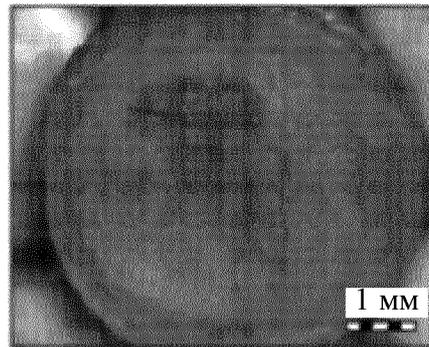
ФИГУРА 3



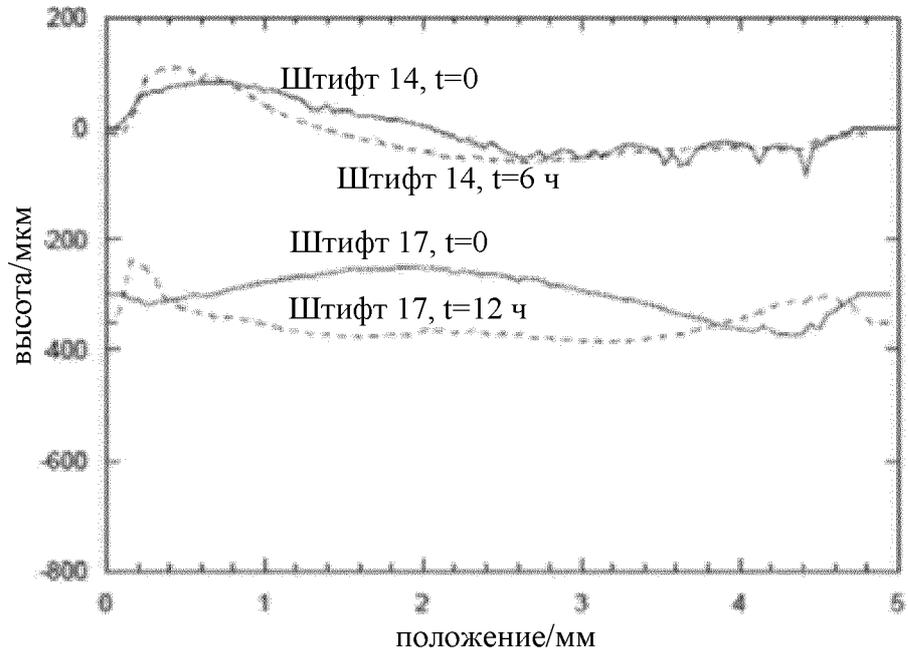
ФИГУРА 4



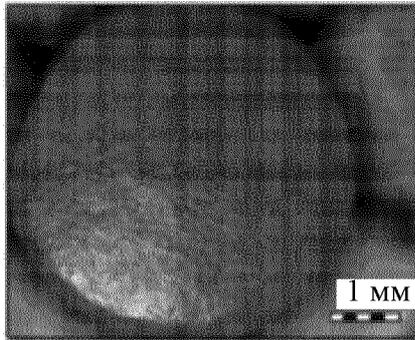
ФИГУРА 5А



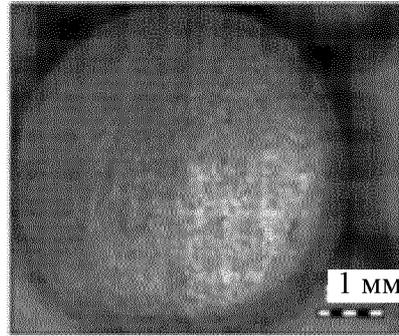
ФИГУРА 5В



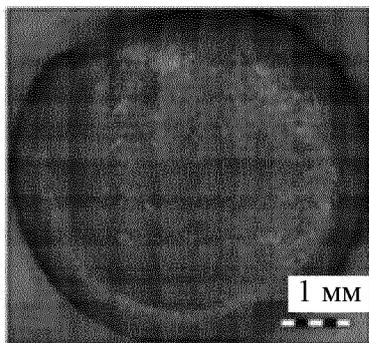
ФИГУРА 6



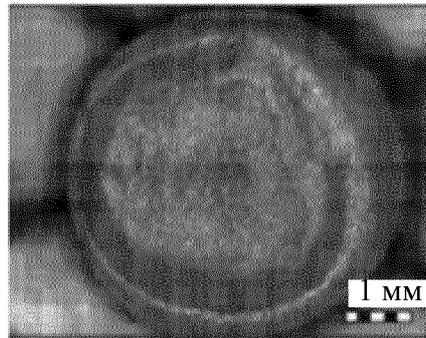
ФИГУРА 7А



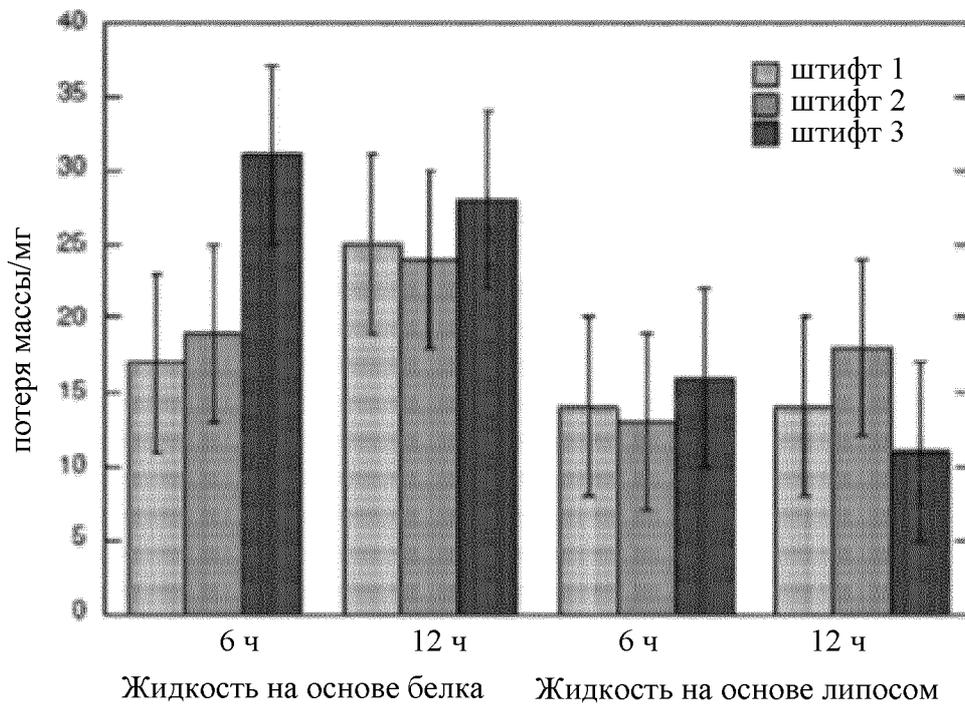
ФИГУРА 8А



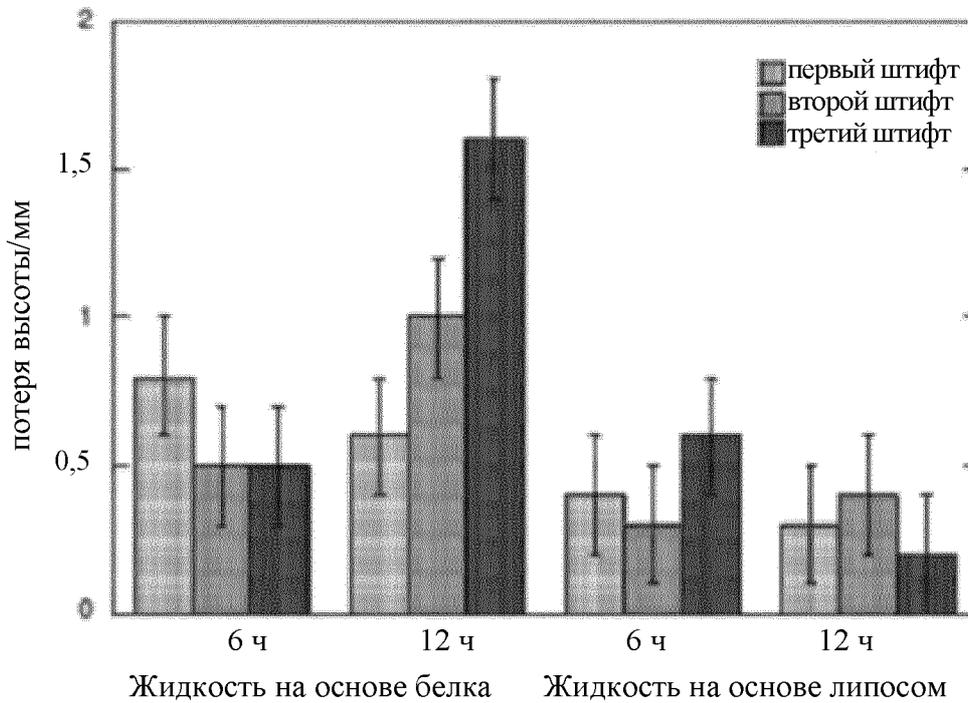
ФИГУРА 7В



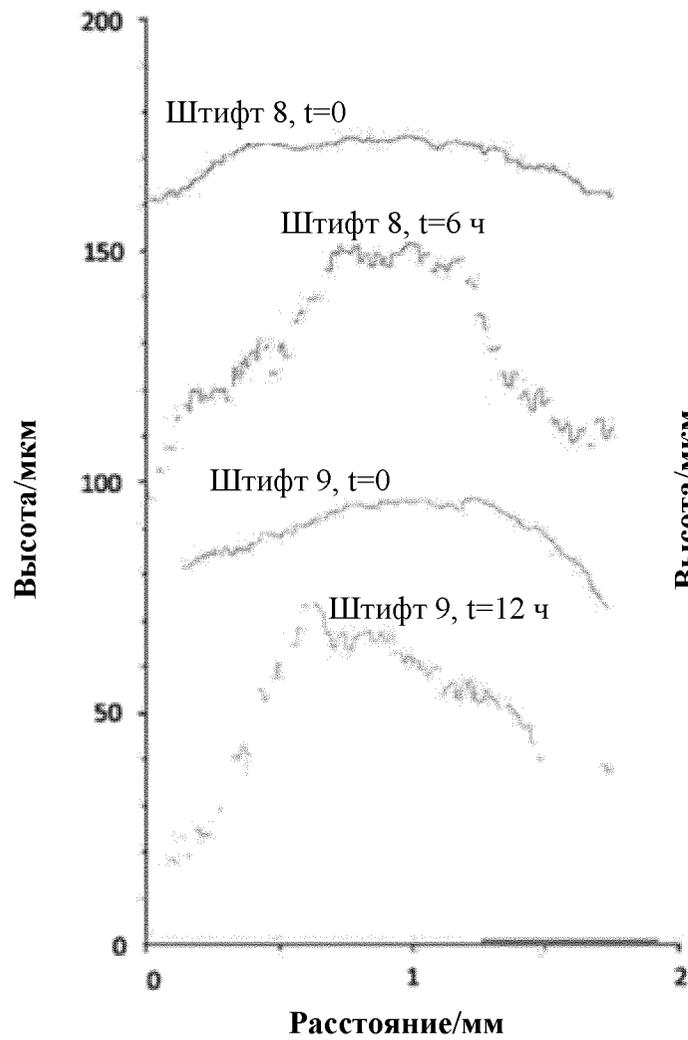
ФИГУРА 8В



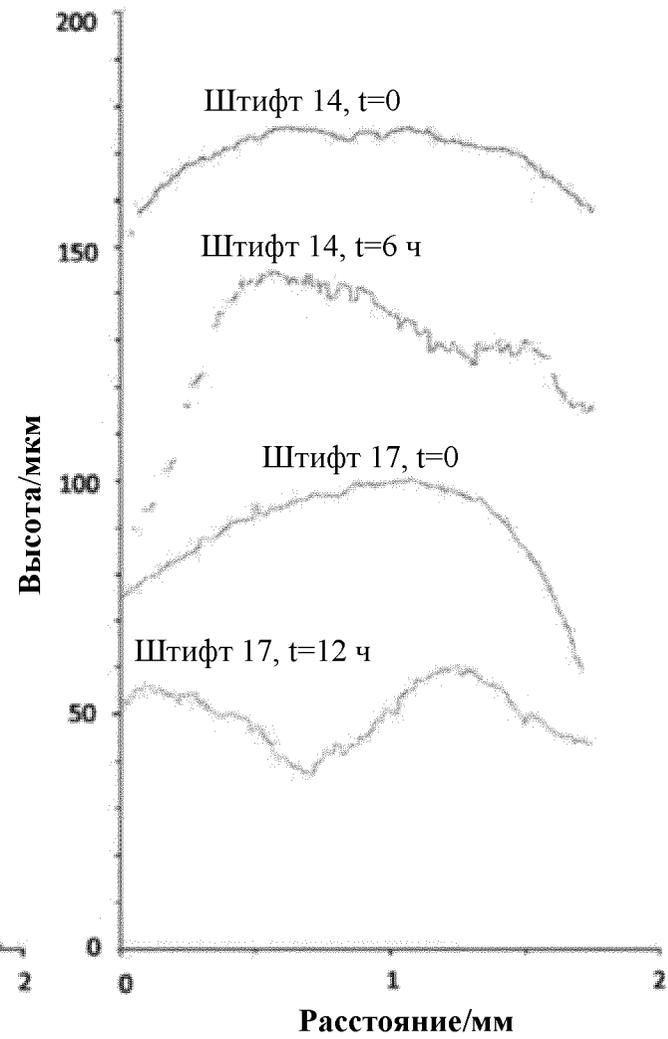
ФИГУРА 9А



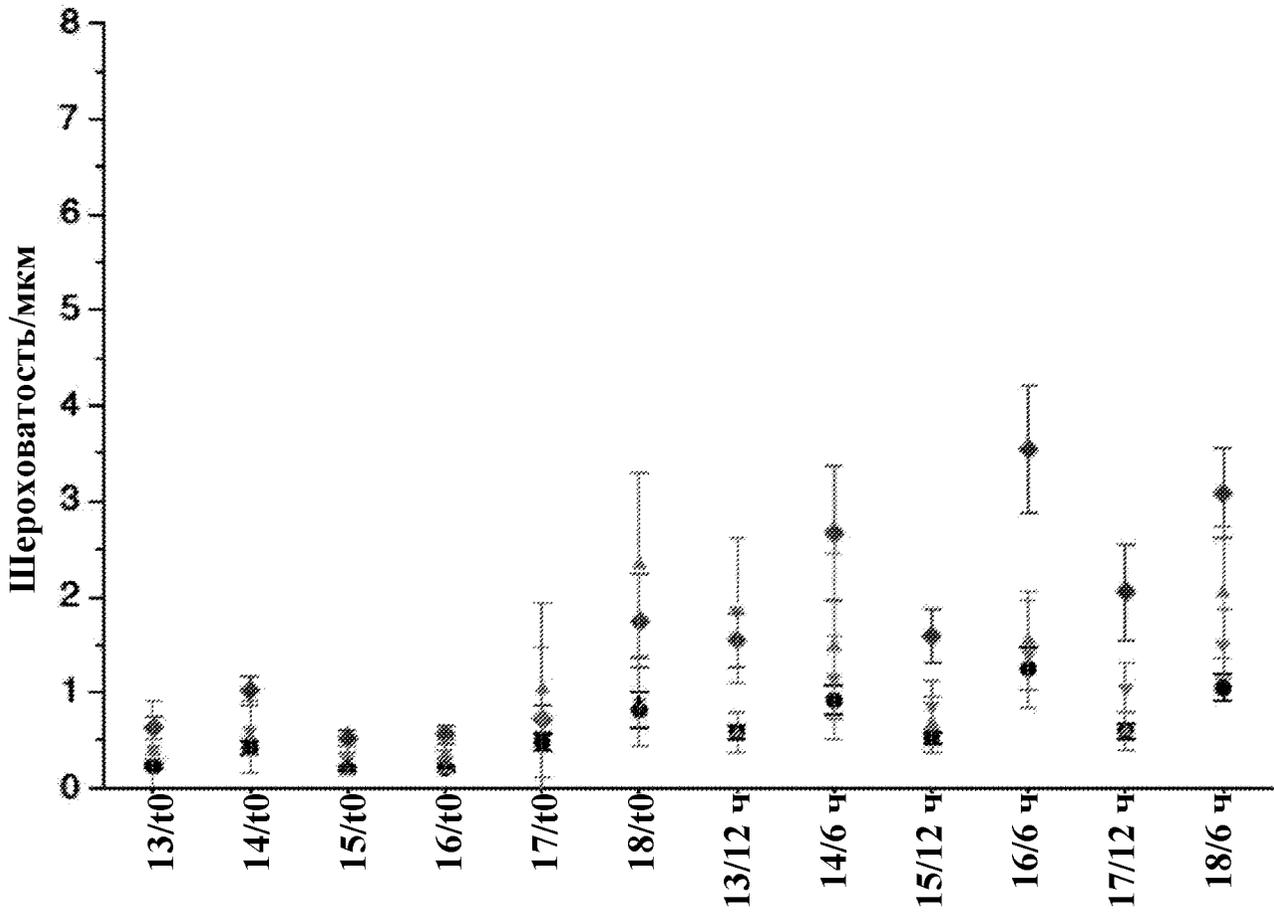
ФИГУРА 9В



ФИГУРА 10А



ФИГУРА 10В



ФИГУРА 11