

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038653**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.29

(21) Номер заявки
201891575

(22) Дата подачи заявки
2017.01.09

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

(54) СОСТАВЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

(31) 62/275,936; 62/275,941; 62/421,137

(32) 2016.01.07; 2016.01.07; 2016.11.11

(33) US

(43) 2019.01.31

(86) PCT/US2017/012720

(87) WO 2017/120586 2017.07.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВЕСТЕРН ЮНИВЕРСИТИ ОФ ХЕЛТ
САЙЕНСИЗ; ТЕЗОРКС ФАРМА,
ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:
**Бетагери Гуру В. (US), Венкатесан
Натараджан (IN), Оффелейн Майкл
Дж. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20120027864
US-A1-20150157572
US-A1-20060024360
US-A1-20110166214
US-A1-20120093718

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам для получения и применения пролипосомных и липосомных составов химиотерапевтических средств. Пролипосомные и липосомные составы химиотерапевтических средств, а также лекарственные средства и лекарственные формы, включающие такие составы, можно использовать со схемами лечения рака мочевого пузыря и уротелиальной карциномы. Таким образом, составы, лекарственные средства и лекарственные формы по изобретению подходят для лечения рака мочевого пузыря посредством внутривезикулярного введения и для лечения уротелиальной карциномы. Составы по изобретению включают (а) таксан (например, паклитаксел, доцетаксел) или цисплатин, (b) первый фосфолипид, дипальмитоилфосфатидилхолин (DMPC), и (с) второй фосфолипид, димиристилфосфатидилглицерин натрия (DMPG). Пролипосомные составы образуют липосомы после контакта с водным средством.

038653 B1

038653

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по заявкам США №№ 62/275941 и 62/275936, зарегистрированным 7 января 2016 года, и № 62/421137, зарегистрированной 11 ноября 2016 года.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к пролипосомным и липосомным составам терапевтических лекарственных средств и их применению в лечении рака мочевого пузыря.

Уровень техники

Введение химиотерапевтических средств для лечения рака мочевого пузыря, как правило, включает внутривезикулярное введение средств непосредственно в мочевой пузырь с использованием мочевого катетера. Однако этот подход для введения химиотерапевтических средств затруднен в случае использования таких химиотерапевтических средств как паклитаксел (Taxol®), для лечения рака мочевого пузыря (Nadaschik et al., "Paclitaxel and cisplatin as intravesical agents against non-muscle invasive bladder cancer" BJU. 101:1347-1355 (2008); Mugabe et al. "Paclitaxel incorporated in hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols for intravesical bladder cancer therapy" BJU. 103:978-986 (2008)). Более конкретно, паклитаксел, например, осаждается в среде с pH в мочевом пузыре, где pH может находиться в диапазоне от 4,5 до 8, и, таким образом, перестает быть биодоступными. Хотя паклитаксел можно растворять в диметилсульфоксиде (DMSO), количество DMSO, необходимое для поддержания в растворе эффективной дозы для лечения рака мочевого пузыря, не является фармацевтически приемлемым. Таким образом, существует потребность в составлении стабильного состава химиотерапевтического средства, который можно вводить внутривезикулярно, и он не будет осаждаться внутри мочевого пузыря.

Эту потребность удовлетворяют композиции и способы, представленные в настоящем описании, в которых терапевтические дозы химиотерапевтического средства составляют в свободнотекущей пролипосомной порошкообразной дисперсии, которую можно диспергировать в водной среде при широком диапазоне значений pH без осаждения лекарственного средства.

Сущность изобретения

Изобретение относится к композициям и способам для получения и применения пролипосомных и липосомных составов химиотерапевтических средств. В различных аспектах композиции по изобретению являются пролипосомными порошкообразными дисперсиями, включающими (a) таксан или цисплатин (в качестве химиотерапевтического средства), (b) дипальмитоилфосфатидилхолин (DMPC) и (c) димиристилфосфатидилглицерин натрия (DMPG). Массовые соотношения a:b:c составляют 1:(1,3-4,5):(0,4-2,5).

В некоторых аспектах изобретения химиотерапевтическим средством в пролипосомных порошкообразных дисперсиях является таксан. Неограничивающие примеры таксана, используемого для получения составов по изобретению, включают паклитаксел, доцетаксел, кабазитаксел, тесетаксел, DJ-927, TPI 287, ларотаксел, ортатаксел, ДНА-паклитаксел или их комбинацию. Например, таксан может являться (a) доцетакселом, и массовые соотношения a:b:c составляют 1:(1,3-2,0):(0,4-2,0).

В других аспектах химиотерапевтическим средством является цисплатин. Пролипосомные дисперсии по изобретению также могут включать, в дополнение к (a) цисплатину, (b) DMPC и (c) DMPG, (d) холестерин и имеют массовые соотношения a:b:c:d 1:(2,5-4,5):(1,0-2,5):(0,5-1).

В различных аспектах изобретения пролипосомные порошкообразные дисперсии могут включать (a) паклитаксел, (b) DMPC и (c) DMPG с массовыми соотношениями a:b:c 1: (1,3-3,8):(0,4-1,5). В дополнение к (a) таксану или цисплатину, (b) DMPC и (c) DMPG, составы по изобретению могут включать (d) холестерин и имеют массовые соотношения a:b:c:d 1:(1,3-3,8):(0,4-1,5):(0,5-1).

В некоторых аспектах изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим любую из пролипосомных порошкообразных дисперсий по изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент. В других аспектах изобретение относится к лекарственным формам, включающим любую из фармацевтических композиций.

В других аспектах изобретение относится к способам получения липосомных составов таксана или цисплатина. Липосомные составы можно получать посредством гидратации любой пролипосомной порошкообразной дисперсии по изобретению в водном средстве. Составы по изобретению также можно получать посредством диспергирования первого липида и второго липида в водном средстве посредством перемешивания, смешивания и/или гомогенизации для получения дисперсии; добавления таксана или цисплатина к дисперсии первого липида и второго липида; гомогенизации дисперсии первого липида, второго липида и таксана или цисплатина для получения липосом, включающих таксан или цисплатин; гомогенизации липосом для получения липосомных частиц наноразмера в дисперсии; добавления криопротектора/липопротектора. В некоторых аспектах изобретения дисперсию можно лиофилизировать для получения пролипосомной порошкообразной дисперсии. В дополнительных аспектах стадию гомогенизации можно осуществлять при высоком давлении и/или при температуре выше T_c/T_g липидов.

В некоторых аспектах изобретения изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим любую из липосомных составов по изобретению.

Изобретение также относится к способам лечения рака мочевого пузыря у пациента посредством введения пациенту фармацевтической композиции по изобретению. В некоторых аспектах фармацевтические композиции можно вводить внутривезикулярно, и рак является немышечным инвазивным раком мо-

чевого пузыря. В определенных аспектах изобретения таксан или цисплатин остаются растворимыми в мочевом пузыре при любом pH от 4,5 до 8.

Изобретение дополнительно относится к способам лечения уротелиальной карциномы верхних мочевыводящих путей у пациента посредством введения пациенту фармацевтической композиции по изобретению. В некоторых аспектах для лечения уротелиальной карциномы верхних мочевыводящих путей фармацевтическую композицию можно вводить в мочеточник и/или почечную лоханку.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена микрофотография включающих паклитаксел липосом, полученных способом получения липосом по примеру 6, полученная с помощью оптического микроскопа (черта соответствует 100 мкм).

На фиг. 2 представлены графики массы тела животных в дни 0, 7 и 14 введения 10 мг/кг пролипосомного внутрипузырного состава паклитаксела (PLIP-001, обозначаемого на фиг. 2 как TSD-001), 15 мг/кг PLIP-001, 15 мг/кг абраксана или физиологического раствора, как описано в примере 8.

На фиг. 3 изображены средние массы тела животных в день 14 введения 10 мг/кг PLIP-001 (PLIP-001 на фиг. 3 обозначают как TSD-001), 15 мг/кг PLIP-001, 15 мг/кг абраксана или физиологического раствора.

На фиг. 4 представлены средние массы мочевого пузыря животных в день 14 после введения 10 мг/кг PLIP-001 (PLIP-001 на фиг. 4 обозначают как TSD-001), 15 мг/кг PLIP-001, 15 мг/кг абраксана или физиологического раствора.

На фиг. 5 представлены средние площади опухолей в день 14 после введения животным 10 мг/кг PLIP-001 (PLIP-001 на фиг. 5 обозначают как TSD-001), 15 мг/кг PLIP-001, 15 мг/кг абраксана или физиологического раствора.

На фиг. 6 представлены средние площади опухолей, измеренные гистологическим способом, в день 14 после введения животным 10 мг/кг PLIP-001, 15 мг/кг PLIP-001, 15 мг/кг абраксана или физиологического раствора.

На фиг. 7 представлена средняя площадь опухоли в день 21 после введения животным 0,5 мг/кг PLIP-001 (PLIP-001 на фиг. 7 обозначают как TSD-001), 2,5 мг/кг PLIP-001, 5 мг/кг PLIP-001, 5 мг/кг паклитаксела (чистого паклитаксела, растворенного в DMSO) или физиологического раствора в течение 21 дней.

На фиг. 8 представлен уровень паклитаксела в плазме в день 21 после внутрипузырного введения 0,5 мг/кг PLIP-001, 2,5 мг/кг PLIP-001, 5 мг/кг PLIP-001 и несоставленного паклитаксела через 21 день введения.

На фиг. 9 представлена концентрация паклитаксела в тканях из криомикротомных срезов после введения PLIP-001 и абраксана в выделенные мочевые пузыри самцов свиней (ex vivo).

Подробное описание

Изобретение относится к композициям и способам для получения и применения пролипосомных и липосомных составов химиотерапевтических средств. Составы по изобретению, а также лекарственные средства и лекарственные формы, включающие такие составы, можно использовать со схемами лечения рака мочевого пузыря. Составы, лекарственные средства и лекарственные формы по изобретению подходят для введения химиотерапевтических средств в мочевой пузырь, а также мочеточник и почечную лоханку. С помощью составов, лекарственных средств и лекарственных форм по изобретению можно предотвращать осаждение составленных химиотерапевтических средств в водной среде мочи при уровнях pH, типичных для среды в мочевом пузыре, которые могут находиться в диапазоне от 4,5 до 8.

С помощью композиций и способов по изобретению лечат различные типы рака мочевого пузыря, включая немышечный инвазивный рак мочевого пузыря (NMIBC). Пролипосомные и липосомные составы по изобретению можно использовать для лечения уротелиальной карциномы, также называемой переходноклеточной карциномой. Уротелиальная карцинома является наиболее распространенным типом рака мочевого пузыря, на который приходится приблизительно 90% всех случаев рака мочевого пузыря. Эти злокачественные новообразования, как правило, являются поверхностными приблизительно в 75% случаев, когда они не прорастают в более глубокие слои стенки мочевого пузыря. Составы по изобретению также можно использовать для лечения других типов рака мочевого пузыря, таких как плоскоклеточная карцинома или аденокарцинома.

Урологи лечат большинство поверхностных опухолей (т.е. тех, которые ограничиваются слизистой оболочкой и собственной пластинкой мочевого пузыря) посредством цистоскопической хирургической операции и в отдельных случаях внутрипузырной медикаментозной терапии. Хотя эти поверхностные раки мочевого пузыря часто рецидивируют и могут являться мультифокальными, коэффициенты выживаемости после лечения, как правило, являются отличными. Однако в случаях когда карцинома пенетрировала мышечную стенку мочевого пузыря (т.е. если злокачественное новообразование прогрессировало до мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря, инвазирующего более глубокие слои стенки мочевого пузыря и, возможно, близлежащие органы, такие как матка, влагалище или предстательная железа), прогноз, как правило, ухудшается. Приблизительно у 50% пациентов с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря будет развиваться метастазирующее заболевание. По этой причине существует очевидная по-

требность в эффективной терапии рака мочевого пузыря.

Пролипосомные и липосомные составы

Способы лечения рака мочевого пузыря по изобретению включают введение суспензий липосом, включающих липосомы, содержащие плохо растворимое в воде лекарственное средство. Липосомы могут являться липосомами наноразмера. Липосомы содержат химиотерапевтическое средство или комбинацию химиотерапевтических средств. Липосомы можно получать посредством гидратации пролипосомных порошкообразных дисперсий по изобретению. Пролипосомные порошкообразные дисперсии являются сухими порошками, которые можно получать, как известно в этой области, например способом получения пленок поливом, как описано в примерах 1-4 ниже и в патентах США №№ 9445995 и 6759058, включенных в настоящее описание в полном объеме. Липосомные составы можно получать, диспергируя пролипосомные порошкообразные дисперсии в водном средстве.

Липосомные составы также можно получать способом без использования органического растворителя, как описано в примере 6 ниже. Как правило, первый липид и второй липид можно диспергировать в водной среде посредством перемешивания, смешивания и/или гомогенизации для получения дисперсии. Затем к дисперсии первого липида и второго липида можно добавлять таксан или цисплатин и можно гомогенизировать дисперсию первого липида, второго липида и таксана или цисплатина для получения липосомы, содержащей таксан или цисплатин. Липосомы можно дополнительно гомогенизировать для получения липосомных частиц наноразмера в дисперсии. В дисперсию можно добавлять криопротектор/липопротектор. При желании дисперсию можно лиофилизировать для получения пролипосомной порошкообразной дисперсии таксана или цисплатина. Более типично этот способ можно использовать для получения составов плохо растворимых в воде лекарственных средств (например, таксана или цисплатина) в комбинации с любым липидом или фосфолипидом. Примеры подходящих фосфолипидов, которые можно использовать в способах получения составов по изобретению, включают дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPSC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилхолин яйца (PC яйца), фосфатидилхолин сои (PC сои), димиристилфосфатидилглицерин натрия (DMPG), 1,2-димиристоил-фосфатидную кислоту (DMPA), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), дипальмитоил фосфат (DPP), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфо-гас-глицерин (DSPG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидную кислоту (DSGPA), фосфатидилсерин (PS), сфингомиелин (SM) или комбинации любых из указанных выше фосфолипидов.

Пролипосомные порошкообразные дисперсии и липосомы по изобретению включают фосфолипидный компонент, включающий первый фосфолипид, димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), и второй фосфолипид, димиристилфосфатидилглицерин натрия (DMPG).

Пролипосомные порошкообразные дисперсии по изобретению содержат, по меньшей мере, (а) химиотерапевтическое средство, (b) первый фосфолипид, DMPC, и (с) второй фосфолипид, DMPG, диспергированные друг в друге и образующие липосому после контакта с водным раствором. Например, пролипосомная порошкообразная дисперсия может содержать (а), (b) и (с) в массовых соотношениях (а):(b):(с), находящихся в диапазоне (1,0):(1,3-4,5):(0,4-2,5). Пролипосомная порошкообразная дисперсия в дополнение к ингредиентам (а)-(с) также может содержать (d) холестерин. Таким образом, пролипосомный состав может содержать (а), (b), (с), (d) в массовых соотношениях (а):(b):(с):(d), находящихся в диапазоне (1,0):(1,0-4,5):(0,1-2,5):(0,1-2,0).

Когда фосфолипиды, такие как DMPC и DMPG, помещают в водную среду, гидрофильные головки соединяются в линейной конфигурации, при этом их гидрофобные хвосты выравниваются, по существу, параллельно друг другу. Затем вторая линия молекул выравнивается в конфигурации "хвост-к-хвосту" с первой линией, так как гидрофобные хвосты пытаются избежать водной среды. Для достижения максимального избегания контакта с водной средой, т.е. на краю бислоев, при одновременной минимизации соотношения площади поверхности и объема и, таким образом, достижения конформации с минимальной энергией две линии фосфолипидов, известные как фосфолипидный бислой или ламелла, соединяются в липосому. При этом липосомы (или фосфолипидные сферы) захватывают внутри сферы часть водной среды и то, что может быть растворено или суспендировано в ней. Она включает различные компоненты пролипосомных порошкообразных дисперсий по изобретению, такие как химиотерапевтическое средство.

Перед введением химиотерапевтического средства или средств способом по изобретению, как правило, посредством внутрипузырного введения в мочевой пузырь, пролипосомную порошкообразную дисперсию, содержащую химиотерапевтическое средство, гидратируют в воде или другом фармацевтически приемлемом водном средстве (например, физиологическом растворе) таким образом, что образуются липосомы, инкапсулирующие химиотерапевтическое средство внутри липосомы. В дополнение к воде или водному средству, полученная липосомная суспензия может содержать лиопротектор/криопротектор, такой как маннит, сахароза или трегалоза. Как правило, лиопротекторный/криопротекторный компонент липосомного состава находится в соотношении мас./мас. с лекарственным компонентом (лиопротектор/криопротектор: лекарственное средство) приблизительно от (0,5:1,0) до (5,5:1,0). Например, липосомную суспензию для использования в способах лечения по изобретению можно получать посредством смешивания пролипосомной порошкообразной дисперсии, со-

держатель (а) химиотерапевтическое средство, (b) DMPC, (c) DMPG и (e) лиопротектор/криопротектор (1,0):(1,0-4,5):(0,1-2,5):(0,5-5,5).

Пролипосомные и липосомные составы по изобретению могут вмещать различные химиотерапевтические средства, известные в этой области для лечения рака мочевого пузыря. Настоящее изобретение включает в качестве неограничивающих примеров таксаны, включая паклитаксел, доцетаксел, DJ-927, TPI 287, ларотаксел, ортатаксел, ДНА-паклитаксел, кабазитаксел и тесетаксел, цисплатин или их смеси, а также комбинации с другими химиотерапевтическими средствами.

Например, пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению, содержащая лекарственное средство-производное таксана ("пролипосомный внутрипузырный состав таксана (PLIT)"), может содержать (а) таксан, (b) первый фосфолипид, DMPC, и (c) второй фосфолипид, DMPG. Пролипосомная порошкообразная дисперсия может содержать (а), (b) и (c) в массовых соотношениях (а):(b):(c), выбранных из (1,0):(1,0-3,8):(0,2-1,5) или любого соотношения между ними. Например, в пролипосомной дисперсии по изобретению массовые соотношения (а):(b):(c) могут являться соотношениями (1,0):(3,15):(1,00), или (1,0):(3,20):(1,05), или (1,0):(3,25):(1,10), или (1,0):(1,43):(0,567) паклитаксела: DMPC:DMPG, соответственно, или любым соотношением между ними. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению может, по существу, состоять из (а) таксана, (b) DMPC и (c) DMPG в любом из указанных массовых соотношений или может состоять из этих компонентов в любом из этих соотношений.

Пролипосомная порошкообразная дисперсия, представленная в настоящем описании, в дополнение к таксану, DMPC и DMPG, также может содержать (d) холестерин. Таким образом, пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению может содержать массовые соотношения (а):(b):(c):(d), выбранные из (1,0):(1,0-3,8):(0,4-1,5):(0,5-1) или любого соотношения между ними. Например, пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению может включать (а) паклитаксел, первый фосфолипид, (b), DMPC, второй фосфолипид, (c), DMPG и (d) холестерин, где массовые соотношения (а):(b):(c):(d) представляют собой (1,0):(3,40):(1,25):(0,70), или (1,0):(3,45):(1,30):(0,75), или (1,0):(3,50):(1,35):(0,80), или любое соотношение между ними. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению может, по существу, состоять из (а) таксана, (b) DMPC, (c) DMPG и (d) холестерина в любом из указанных массовых соотношений или может состоять из этих компонентов в любом из этих соотношений.

Альтернативно пролипосомный и липосомный состав по изобретению может содержать, например, цис-диаминдихлорплатину (II), общеизвестную как цисплатин, в качестве химиотерапевтического средства. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению, содержащая цисплатин ("пролипосомный внутрипузырный состав цисплатина (PLIC)"), может содержать (а) цисплатин, (b) первый фосфолипид, DMPC и (c) второй фосфолипид, DMPG. Пролипосомная порошкообразная дисперсия цисплатина может содержать (а), (b) и (c) в массовых соотношениях (а):(b):(c), выбранных из (1,0):(2,5-4,5):(1-2,5) или любого соотношения между ними. Например, массовые соотношения (а):(b):(c) могут представлять собой (1,0):(2,7):(1,2), или (1,0):(2,75):(1,21), или (1,0):(2,76):(1,22), или (1,0):(2,77):(1,2), или (1,0):(2,78):(1,22), или любое соотношение между ними. В пролипосомной порошкообразной дисперсии, где (а) является цисплатином, массовые соотношения (а):(b):(c) могут представлять собой (1,0):(2,7):(1,2), или (1,0):(2,75):(1,21), или (1,0):(2,76):(1,22), или (1,0):(2,77):(1,2), или (1,0):(2,78):(1,22), или любое соотношение между ними. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению может, по существу, состоять из (а) цисплатина, (b) DMPC и (c) DMPG в любом из указанных массовых соотношений или может состоять из этих компонентов в любом из этих соотношений.

В пролипосомных порошкообразных дисперсиях по изобретению массовые соотношения (а):(b):(c) могут представлять собой (1,0):(4,1):(2,1), или (1,0):(4,15):(2,25), или (1,0):(4,16):(2,26), или (1,0):(4,17):(2,27), или любое соотношение между ними. В пролипосомной дисперсии, в которой (а) является цисплатином, первый фосфолипид (b) является DMPC и второй фосфолипид (c) является DMPG, массовые соотношения (а):(b):(c) могут представлять собой (1,0):(4,1):(2,1), или (1,0):(4,15):(2,25), или (1,0):(4,16):(2,26), или (1,0):(4,17):(2,27), или любое соотношение между ними.

Пролипосомная порошкообразная дисперсия по изобретению может, по существу, состоять из (а) цисплатина, (b) DMPC и (c) DMPG в любом из указанных массовых соотношений или может состоять из этих компонентов в любом из этих соотношений.

Пролипосомная порошкообразная дисперсия цисплатина, в дополнение к (а) цисплатину, (b) DMPC и (c) DMPG, может содержать (d) холестерин. Такой состав цисплатина может содержать массовые соотношения (а):(b):(c):(d), выбранные из (1,0):(2,5-4,5):(1,0-2,5):(0,5-1) или любого соотношения между ними. Массовые соотношения (а):(b):(c):(d) могут представлять собой, например, (1,0):(2,7):(1,2):(0,6), или (1,0):(2,75):(1,21):(0,65), или (1,0):(2,76):(1,22):(0,7), или (1,0):(2,77):(1,2):(0,75), или (1,0):(2,78):(1,22):(0,8), или (1,0):(2,78):(1,22):(0,9), или любое соотношение между ними.

Пролипосомные порошкообразные дисперсии и липосомные составы по изобретению можно использовать в фармацевтических составах или лекарственных формах, вводимых индивидуумам, нуждающимся в химиотерапевтическом средстве (например, паклитакселе, доцетакселе, цисплатине и т.д.). Фармацевтические составы или лекарственные формы по изобретению можно вводить для лечения рака мочевого пузыря. Более конкретно при терапевтическом применении фармацевтический состав или лекарственную форму вводят индивидууму, уже страдающему раком мочевого пузыря, в количестве, дос-

таточном для устранения всех симптомов или, по меньшей мере, частичного облегчения по меньшей мере одного из симптомов рака мочевого пузыря. Дозы химиотерапевтического средства, эффективные для этого применения, зависят от стадии, тяжести и течения рака мочевого пузыря, предшествующей терапии, состояния здоровья индивидуума, массы тела, ответа на лекарственные средства и/или решения лечащего врача.

Как описано ниже в примерах 1-4, для получения пролипосомной порошкообразной дисперсии химиотерапевтического средства химиотерапевтическое средство (например, паклитаксел) можно растворять вместе с липидами в этаноле и можно получать тонкую пленку с использованием ротационного испарителя мгновенного вскипания. Высушенную пленку можно гидратировать с использованием нормального физиологического раствора, или воды, или любого другого фармацевтически приемлемого водного средства. Таким образом, получают липосомную дисперсию. Затем липосомную дисперсию можно экструдировать с использованием Emulsiflex™-C5 (Avestin, Canada) или схожего гомогенизатора высокого давления или подходящих устройств, известных в этой области, с помощью которых можно достигать желаемых размеров частиц. В липосоме по изобретению частицы могут иметь наноразмер. Липосома по изобретению, как правило, может иметь частицы размером до 10700 нм, до 500 нм, до 250 нм, до 200 нм или до 100 нм.

В липосомную дисперсию по изобретению можно добавлять подходящие эксципиенты извне и подвергать лиофилизации для получения пролипосомной порошкообразной дисперсии, т.е. эксципиенты добавляют "извне". Например, пролипосомную порошкообразную дисперсию по изобретению можно смешивать по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают: (а) криопротектор, наполнители, такие как, например, маннит, крахмалы, лактоза (например, моногидрат лактозы), сахароза, глюкоза, трегалоза и кремниевая кислота; (б) связывающие средства, такие как, например, производные целлюлозы, включая гидроксипропилметилцеллюлозу, коммерчески доступную как Benecel™, гидроксипропилцеллюлозу, коммерчески доступную как Klucel™ (Ashland Inc-Covington, KY), крахмал, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахарозу и гуммиарабик, (с) ускорители абсорбции, такие как, например, соединения четвертичного аммония.

Внутрипузырное введение

Составы и лекарственные формы по изобретению можно использовать для введения терапевтической дозы химиотерапевтического средства (например, таксана, такого как паклитаксел, доцетаксел и/или цисплатин) внутрипузырно в мочевой пузырь. Внутрипузырная терапия включает инстилляцию терапевтического средства непосредственно в мочевой пузырь посредством введения мочеточникового катетера. При типичной внутрипузырной инстилляции стерильную катетеризацию можно осуществлять с использованием прямого катетера или катетера типа Кудэ (в случае мужчин). Мочевой пузырь полностью опустошают. Можно вводить шприц с катетерным наконечником, включающий адаптер на конце шприца для предотвращения утечки или разбрызгивания при введении. Или в катетер можно вставлять заправленные трубки, присоединенные к сосуду с лекарственным средством, и инстиллировать химиотерапевтическое средство самотеком или посредством осторожной инъекции. Пациента можно оценивать на наличие боли. Шприц или сосуд с лекарственным средством можно удалять, оставляя трубки интактными. Катетер зажимают и удаляют катетер или пробку катетера, как указано, с использованием стерильной марли для впитывания любых капель. Если у пациента возникают трудности в удержании раствора, можно использовать катетер Фолея и вставлять пробку катетера в конец катетера после инстилляции таким образом, что химиотерапевтическое средство остается в мочевом пузыре в течение определенного периода времени, как правило, от 1 до 2 ч. В зависимости от подвижности пациента, катетер можно удалять в конце желаемого времени воздействия или пациента можно подключать к мочевому дренажному мешку для дренажа химиотерапевтического средства. После удаления и соответствующей утилизации катетера область промежности обследуют на предмет протечек и пациента оценивают на наличие боли. Пациента инструктируют, чтобы он попытался удержать лекарственное средство в течение от 1 до 2 ч. Исторически сложилось так, что пациента инструктируют лежать и каждые 15 мин переворачиваться с левого бока на правый, затем на спину для смещения пузырьков воздуха из катетера и для обеспечения контакта лекарственного средства со всеми областями мочевого пузыря.

Примеры устройств для внутрипузырного введения лекарственных средств и способов использования этих устройств для мочевого пузыря описаны в следующих публикациях патентных заявок США: №№ 20150165178, 2012/0203203, 2012/0089122, 2012/0089121, 2011/0218488, 2011/0202036, 2011/0152839, 2011/0060309, 2010/0331770, 2010/0330149, 2010/0003297, 2009/0149833 и 2007/0202151, все из которых включены в настоящее описание в полном объеме.

В дополнение к внутрипузырному введению, составы и лекарственные формы по изобретению можно вводить в мочеточник и/или почечную лоханку с использованием подходящего катетерного устройства и способа, известного в этой области. Такое введение химиотерапевтического средства можно использовать для лечения, например, уротелиальной карциномы верхних мочевыводящих путей.

Если составы и лекарственные формы по изобретению вводят с помощью устройства для введения

лекарственного средства, составы и лекарственные формы можно помещать в устройство в различных формах, которые могут зависеть от конкретного механизма, посредством которого устройство высвобождает пролипосомные порошкообразные дисперсии, липосомные составы, фармацевтические составы и лекарственные формы в мочу в мочевом пузыре и/или другой части мочевыделительной системы. Лекарственная форма может находиться в твердой, полутвердой или другой нежидкой форме (например, порошке или прессованном порошке), которая предпочтительно может облегчать стабильное хранение химиотерапевтического средства до использования устройства и может сделать возможным хранение химиотерапевтического средства в меньшем объеме, чем было бы возможно, если бы средство хранили в форме жидкого раствора или суспензии.

При использовании составов по изобретению химиотерапевтические средства могут оставаться растворимыми в моче человека при типичном pH мочи 4,5-8 после внутривезикулярного введения. Кроме того, составы по изобретению позволяют химиотерапевтическому средству прикрепляться к стенкам мочевого пузыря, и химиотерапевтическое средство может персистировать в выпущенной моче в течение до 3 дней.

Парентеральное введение

Пролипосомные порошкообразные дисперсии, липосомные составы, фармацевтические составы и лекарственные формы по изобретению можно использовать для получения композиций для парентерального введения пациенту терапевтической дозы таксана (например, паклитаксела или доцетаксела) или цисплатина. Парентеральное введение включает внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, интрацеребровентрикулярный или подкожный пути введения.

Инъекционные композиции можно получать в общепринятых формах в виде жидких растворов или суспензий, твердых формах, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией или в виде эмульсий. Инъекционные средства, растворы и эмульсии также могут содержать один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при желании фармацевтические композиции, подлежащие введению, также могут содержать незначительные количества нетоксических вспомогательных средств, таких как увлажнители или эмульгаторы, pH-буферные средства, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие средства, такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

Подходящие фармацевтические эксципиенты, известные в этой области, можно комбинировать с пролипосомной порошкообразной дисперсией по изобретению для получения фармацевтического состава или лекарственной формы.

Комбинированное лечение

Пролипосомные порошкообразные дисперсии, липосомные составы, фармацевтические составы и лекарственные формы по изобретению можно вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, снижающими тяжесть или устраняющими неблагоприятные воздействия, связанные с химиотерапией, включая тошноту, рвоту, потерю аппетита, диарею, утрату чувства вкуса, потерю волос, онемение/покалывание/холодность/посинение рук или ступней, боль/покраснение/отек рук или ног, утрату рефлексов, утрату баланса, проблемы с походкой, мышечные судороги/спазмы/слабость, боль в шее или позвоночнике, язвы во рту или на языке, боль в суставах, отек ног или ступней, ментальные изменения/изменения настроения, головную боль, частое/нерегулярное сердцебиение, кровь в моче, рвотные массы в виде кофейной гущи, черный или кровавый стул, болезненное или затрудненное мочеиспускание, боль внизу спины или в боку или изменения зрения (например, нечеткость зрения, изменение цветового зрения).

В конкретных случаях целесообразно вводить пролипосомные порошкообразные дисперсии, фармацевтические составы и лекарственные формы по изобретению с другим терапевтическим средством. Например, пролипосомные порошкообразные дисперсии паклитаксела можно использовать в фармацевтическом составе или лекарственной форме, вводимой в качестве части комбинированного лечения, включающего гемцитабин, для лечения рака мочевого пузыря. Пролипосомные порошкообразные дисперсии цисплатина по изобретению можно использовать в фармацевтическом составе или лекарственной форме, вводимой в качестве части комбинированного лечения, включающего 5-фторурацил (5-FU), для лечения рака мочевого пузыря. Пролипосомные порошкообразные дисперсии паклитаксела также можно использовать в фармацевтическом составе или лекарственной форме, вводимой в качестве части комбинированного лечения, включающего пролипосомные составы цисплатина.

Если используют комбинированную терапию, другие средства можно не вводить в той же фармацевтической композиции и их можно вводить другими путями из-за других физических и химических характеристик. Например, исходное введение можно осуществлять по определенным протоколам, а затем, в зависимости от наблюдаемых эффектов, можно дополнительно модифицировать дозу, способы введения и время введения.

Множество терапевтических средств можно вводить одновременно (например, одновременно, по существу одновременно или в рамках одного протокола лечения) или последовательно, в зависимости от стадии и типа злокачественного новообразования, состояния пациента и конкретного выбора используемого соединения. Определение порядка введения и количества повторений введения каждого терапевти-

ческого средства по протоколу лечения может зависеть от развития заболевания, подвергаемого лечению, и состояния индивидуума.

Отдельные химиотерапевтические средства из таких комбинаций вводят последовательно или одновременно в отдельных или комбинированных фармацевтических составах. Например, отдельные терапевтические средства можно вводить одновременно в комбинированном фармацевтическом составе. Подходящие дозы известных терапевтических средств будут понятны специалистам в этой области.

Комбинации по изобретению можно успешно использовать в форме фармацевтических композиций вместе с фармацевтически приемлемыми дилуентами или носителями.

Примеры

В следующих примерах 1-4 описывают получение пролипосомных внутрипузырных составов паклитаксела (PLIP) PLIP-003, PLIP-006, PLIP-021 и PLIP-023 соответственно. Получение указанных выше составов PLIP осуществляли посредством совместного растворения всех лекарственных средств и липидных ингредиентов для каждого состава, как указано в табл. 1-4, соответственно в 10 мл этанола в круглодонной колбе объемом 500 мл и помещали на водяную баню при 50°C. Тонкую пленку получали из смеси липидных ингредиентов и этанола посредством ее высушивания с использованием ротационного испарителя мгновенного вскипания (Buchi) при пониженном давлении. Пленку полностью высушивали в течение ночи при комнатной температуре при пониженном давлении (150-200 мбар). Пленку гидратировали с использованием 20 мл физиологического раствора, помещая колбу на водяную баню при 50°C. Колбу вращали с использованием ротационного испарителя мгновенного вскипания Buchi, что приводило к образованию липосомной дисперсии. Затем дисперсию гомогенизировали при комнатной температуре под высоким давлением с использованием гомогенизатора высокого давления Nano DeBee® для получения униламеллярных липосом с диапазоном размера частиц 100-200 нм. Затем полученную дисперсию экструдировали с использованием гомогенизатора EmuSiFlex®-C5. Экструзию осуществляли с использованием поликарбонатной мембраны с диаметром пор, снижающимся от 1 мкм к 0,2 мкм. К конечному продукту экструзии добавляли количество маннита, как указано в табл. 1-4 соответственно, и смесь лиофилизировали для получения пролипосомных порошкообразных дисперсий.

Пример 1. PLIP-003.

Таблица 1

Ингредиенты	Количество
Паклитаксел (молекулярная масса=853,9 Да)	24 мг
DMPG (молекулярная масса=688,9 Да; T _c =23°C)	25,2 мг
DMPC (молекулярная масса=677,9 Да; T _c =24°C)	77,5 мг
Маннит	100 мг

Пример 2. PLIP-006.

Таблица 2

Ингредиенты	Количество
Паклитаксел (молекулярная масса=853,9 Да)	25,2 мг
DMPG (молекулярная масса=688,9 Да; T _c =23°C)	33,8 мг
DMPC (молекулярная масса=677,9 Да; T _c =24°C)	84,4 мг
Холестерин (молекулярная масса=386,65 Да)	20,1 мг
Маннит	27 мг

Пример 3. PLIP-021.

Таблица 3

Ингредиенты	Количество
Паклитаксел	27,4 мг
DMPG	12,2 мг
DMPC	90,4 мг
Маннит	50 мг

Пример 4. PLIP-023.

Таблица 4

Ингредиенты	Количество
Паклитаксел	25,2 мг
DMPG	18,2 мг
DMPC	90,4 мг
Маннит	50 мг

Пример 5. Анализ *in vitro* эффективности PLIP-003, PLIP-006, PLIP-021 и PLIP-023.

Подход на основе анализа сульфородамина В (SRB) использовали для определения ингибиторной концентрации (IC)₅₀ составов паклитаксела PLIP-003, PLIP-006, PLIP-021 и PLIP-023 против линий клеток эпителиальной карциномы мочевого пузыря человека T24 (ATCC® HTB-4™), 5637 (ATCC® HTB-9™) и HT-1376 (ATCC® CRL-1472™). Для использования в анализах составы паклитаксела повторно диспергировали в нормальном физиологическом растворе до концентрации 2-5 мг/мл паклитаксела. Диспергированные составы образовывали чистые растворы. Чистый, несоставленный раствор паклитаксела ([6 мг/100 мкл] в DMSO) использовали в качестве контрольного состава.

Клетки высевали на 96-луночные планшеты при плотности 5×10^3 клеток/лунку и культивировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Диспергированные составы паклитаксела и чистые контрольные лекарственные средства добавляли в среды посеянных культур клеток. Через 72 ч обработки составами среды аспирировали. Обработанные клетки фиксировали посредством осторожного добавления 100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты (TCA) в каждую лунку и планшеты инкубировали при 4°C в течение по меньшей мере 1 ч. После инкубации планшеты пять раз промывали водопроводной водой, не допуская попадания струи воды непосредственно в лунки, планшеты сушили на воздухе при комнатной температуре и в каждую лунку добавляли 50 мкл 0,4% мас./об. SRB (в 1% уксусной кислоте). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в растворе SRB в течение от 20 до 30 минут. Затем планшеты пять раз промывали 1% уксусной кислотой и сушили на воздухе при комнатной температуре. Связанный с белком SRB определяли посредством добавления 100 мкл 10 mM раствора Трис-основания в каждую лунку, позволяя раствору Трис солиubilизировать SRB в течение от 5 до 10 мин. Планшеты считывали с использованием микроспектрофотометра для чтения планшетов при 565 нм. В табл. 5 приведены значения IC₅₀ для PLIP-003, PLIP-006, PLIP-021, PLIP-023 и несоставленного паклитаксела.

Таблица 5

Состав PLIP	Линия клеток	IC ₅₀ (мкг/мл)
PLIP-003	T24	Очень низкая (<0,1)
	5637	Очень низкая (<0,1)
	HT1376	Очень низкая (<0,1)
PLIP-006	T24	0,6613
	5637	0,5591
	HT1376	1,147
PLIP-021	T24	Очень низкая (<0,1)
	5637	Очень низкая (<0,1)
	HT1376	Очень низкая (<0,1)
PLIP-023	T24	Очень низкая (<0,1)
	5637	Очень низкая (<0,1)
	HT1376	Очень низкая (<0,1)
Паклитаксел в DMSO	T24	Очень низкая (<0,1)
	5637	Очень низкая (<0,1)
	HT1376	Данные недоступны

Пример 6. Альтернативный способ получения липосомных частиц наноразмера, содержащих плохорастворимое в воде лекарственное средство, осуществляли следующим образом.

1. Липидные ингредиенты DMPC и DMPG взвешивали и переносили в водную среду.
2. Водную среду держали при более высокой температуре, чем T_c/T_g липидных ингредиентов.
3. Липиды гидратировали, либо позволяя липидной смеси отстояться, либо перемешивая, смешивая и/или гомогенизируя.
4. В липидную дисперсию добавляли плохорастворимое в воде лекарственное средство (модифици-

рованный таксан, такой как паклитаксел, или содержащее платину лекарственное средство, такое как цисплатин) и смеси лекарственного средства и липида позволяли продолжать перемешиваться.

5. Для получения липосом дисперсию, содержащую липид и лекарственное средство, гомогенизировали под высоким давлением и при температуре выше T_c/T_g липидов. Гомогенизацию продолжали до включения лекарственного средства в липосому. Включение лекарственного средства подтверждали посредством микроскопического анализа липосом на отсутствие каких-либо кристаллов лекарственного средства.

6. После включения лекарственного средства осуществляли последующую гомогенизацию при температуре немного выше, равной или ниже T_c/T_g липидов для получения липосомных частиц наноразмера, содержащих лекарственное средство.

7. К липосомным частицам добавляли подходящий криопротектор/липопротектор, а затем осуществляли лиофилизацию для получения нагруженных лекарственным средством пролипосом.

Преимущества описанного выше альтернативного способа получения липосомных частиц наноразмера, содержащих лекарственное средство, включают отсутствие необходимости использования органических или жестких растворителей, таких как этанол, хлороформ и/или простой эфир. Кроме того, этот способ включает меньшее количество операций и/или меньшее количество устройств, задействованных в способе. Для способа также требуется значительно меньшее количество времени для получения липосомных частиц, содержащих лекарственное средство, по сравнению со способом получения пленок поливом, описанным в примерах 1-4 (2 ч по сравнению с двумя днями). Он является простым, быстрым и экономичным способом.

Пример 7. PLIP-001.

Альтернативный способ получения липосомных частиц наноразмера, содержащих плохо растворимое в воде лекарственное средство, как описано в примере 6, использовали для получения состава паклитаксела PLIP-001, включающего ингредиенты, описанные в табл. 6. Количества ингредиентов PLIP можно корректировать пропорционально количеству РТХ с учетом массового соотношения.

PLIP-001.

Таблица 6

Ингредиенты	Количество
Паклитаксел	6 мг
DMPG	3, 4 мг
DMPC	8, 6 мг
Маннит	15 мг
Стерильная вода	1 мл

Пример 8. Оценка эффективности PLIP-001 против рака мочевого пузыря человека в ортотопической модели на мышах.

Паклитаксел (РТХ) высокоактивен против метастазирующего рака мочевого пузыря; таким образом, РТХ является потенциальным кандидатом для адьювантной внутривульварной терапии для профилактики рецидивирования и прогрессирования NMIBC. РТХ является липофильным. Существующие составы (например, Taxol/AbraXane®) нерастворимы в кислой внутривульварной водной среде. При правильном составлении липофильные свойства РТХ создают потенциал для проникновения через уретер и доставки в подслизистую оболочку. В следующем исследовании показано успешное введение PLIP-001-составленного РТХ в мочевой пузырь и доказательства правильности концепции PLIP-001 *in vitro* и *in vivo*.

Ортотопическую модель на мышах использовали для оценки пролипосомного состава паклитаксела. Для этих исследований использовали клон 6 линии клеток рака мочевого пузыря KU7/GFP. Клон 6 KU7/GFP стабильно трансфицировали с использованием зеленого флуоресцентного белка и эти линии клеток использовали для всех исследований *in vivo*. Линии клеток клона 6 KU7/GFP описаны в Watanabe et al. Клетки выращивали в модифицированной минимальной поддерживающей среде, дополненной 10% FCS, и инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Опухоли, полученные из клеток KU7/GFP, получали *in vitro*. Опухоли имплантировали в мочевой пузырь самок мышей. Через семь дней после имплантации опухолей KU7/GFP мышей разделяли на следующие четыре экспериментальные группы, в которых мышам вводили 10 мг паклитаксела/кг массы тела (10 мг/кг), вводимых как PLIP-001 (группа 1); 15 мг/кг, вводимых как PLIP-001 (группа 2); 15 мг/кг, вводимых как AbraXane®, связанная с альбумином форма наночастиц паклитаксела, производимая Celgene Corporation (группа 3), или физиологический раствор (группа 4). Указанные выше составы и физиологический раствор вводили в день 0, день 7 и день 14 после имплантации опухолей.

В табл. 7, 8 и 9 представлены массы тела и средние значения массы тела животных в каждой из групп 1-4 в дни 0, 7 и 14 введения соответственно. На фиг. 2 представлены графики масс тела животных в дни 0, 7 и 14 введения.

Таблица 7. Массы тела в день 0 введения PLIP-001 после имплантации опухоли

ID мыши	Масса (г)			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1	15,39	19,19	17,69	17,72
2	19,26	18,14	13,91	17,75
3	19,35	16,98	18,94	17,82
4	15,1	18,83	18,98	15,16
5	16,93	19,39	19,72	11,81
6	18,61	19,67	16,45	17,89
7	19,08	16,21	18,96	20,06
8	18,28	17,18	16,23	18,36
9	18,56	14,02	16,14	18,79
10	16,28	15,78	15,05	16,12
Среднее	17,68	17,54	17,21	17,15
SD	1,62	1,84	1,94	2,31
SE	0,51	0,58	0,61	0,73

Таблица 8. Массы тела в день 7 введения PLIP-001 после имплантации опухоли

ID мыши	Масса (г)			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1	16,68	21,08	18,05	20,54
2	19,56	17,75	18,32	19,88
3	19,72	18,98	20,81	18,12
4	20,5	21,53	20,82	19,88
5	18,66	23,61	19,46	10,36
6	20,61	19,43	18,76	20,84
7	18,26	18,39	19,28	22,96
8	19,12	15,23	18,16	21,06
9	20,29	16,09	17,86	17,78
10	18,72	17,06	17,97	17,09
Среднее	19,21	18,92	18,95	18,85
SD	1,20	2,59	1,12	3,46
SE	0,38	0,82	0,35	1,09

Таблица 9. Массы тела в день 14 введения PLIP-001 после имплантации опухоли (фиг. 3)

ID мыши	Масса (г)			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1	19,58	22,28	16,16	21,44
2	20,48	19,89	18,72	21,83
3	21,41	19,87	23,55	17,81
4	23,92	21,98	22,85	21,37
5	20,63	16,22	23,06	9,96
6	21,36	20,58	22,31	21,09
7	умерла	14,03	20,16	22,89
8	21,06	14,39	18,91	19,31
9	22,29	20,35	18,71	17,66
10	15,36	20,01	21,09	19,01
Среднее	20,68	18,96	20,55	19,24
SD	2,34	2,99	2,42	3,71
SE	0,78	0,94	0,77	1,17

Массы мочевого пузыря (В-В) исследуемых мышей в группах 1-4, измеренные в день 14 введения, приведены в табл. 10. Статистический анализ сравнения массы мочевого пузыря в группах приведен в табл. 6, размеры мочевого пузыря в исследуемых группах приведены в табл. 11.

Таблица 10. Массы мочевого пузыря

ID мыши	В-В (мг)	В-В (мг)	В-В (мг)	В-В (мг)
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1	389*	121,80	59,90	41,60
2	89,30	82,80	25,10	12,40
3	55,20	142,3*	61,90	99,80
4	20,50	67,1	66,10	112,50
5	60,50	67,9	20,20	18,50
6	69,60	66,3	31,60	81,60
7		75,1	84,40	583,20
8	33,30	55,9	35,00	65,20
9	27,70	38,5	85,80	38,40
10	63,10	33,20	29,50	347,20
Среднее	52,40	67,62	49,95	140,04
SD	23,42	25,97	24,62	183,12

Таблица 11. Статистический анализ

Группы	Группа 1 и группа 2	Группа 1 и группа 3	Группа 3 и группа 2
t-критерий Стьюдента	0,223	0,832	0,146
Группы	Группа 1 и группа 4	Группа 2 и группа 4	Группа 3 и группа 4
t-критерий Стьюдента	0,167	0,257	0,140

Таблица 12. Размеры мочевого пузыря

ID мыши	Размеры мочевого пузыря (мм ²)	Размеры мочевого пузыря (мм ²)	Размеры мочевого пузыря (мм ²)	Размеры мочевого пузыря (мм ²)
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1	56*	30	21	0
2	15,00	20,25	6	2,30
3	13,80	24,5*	24	28,8
4		15	15	33,3
5	15,00	20	5,4	7,50
6	12,50	16	10	18,2
7	умерла	20	10	70
8	6,00	22	6	25
9	10,00	10,2	33,6	10
10	18,00	9	10	56
Среднее	12,90	18,05	14,1	26,11
SD	3,91	6,401953	9,333452	0

(В таблице символом * указано наличие опухоли вне мочевого пузыря, возникшей, вероятно, из-за перфорации мочевого пузыря, когда мышам инокулировали злокачественные клетки. Если опухоль локализована вне мочевого пузыря, не ожидают, что внутрипузырное введение химиотерапевтического средства будет иметь эффект в отношении опухоли).

Пример 9. Оценка эффективности пролипосомных составов паклитаксела посредством измерения площади опухоли.

Ортотопическая модель MetaMouse® рака мочевого пузыря человека KU-7-GFP: линию клеток KU-7 рака мочевого пузыря человека, экспрессирующую GFP, получали из банка линий клеток AntiCancer Inc. Животным проводили трансплантацию посредством внутрипузырной инстиляции с использованием клеток рака мочевого пузыря KU-7-GFP. Животных анестезировали с использованием смеси кетамина, ацепромазина и ксилазина. Область хирургической операции стерилизовали йодом и спиртом. После правильного выделения мочевого пузыря после нижнесрединной лапаротомии мочевой пузырь катетеризовали ангиокатетером 24-G, дренировали и повреждали, царапая выстилку мочевого пузыря иглой. Клетки KU-7-GFP (100 мкл, 2×10^6) инстиллировали в мочевой пузырь и накладывали кисетный шов для окклюзии уретры для удержания клеток в течение 1 ч. Затем мочевой пузырь возвращали в брюшную полость. Лапаротомическое отверстие в стенке брюшной полости закрывали хирургическим швом 6-0 в один слой. Животных держали под анестезией изофлураном в течение хирургической операции. Всю описанную выше операцию проводили с использованием микроскопа с 7-кратным увеличением (Olympus). Животных держали в барьерной системе с HEPA-фильтрацией.

В день 7 после имплантации опухолевых клеток пятьдесят животных случайным образом разделяли на пять групп (каждая исследуемая группа содержала n=10 мышей). Введение во всех группах для всех мышей начинали в один и тот же день, считающийся днем исследования 0. В табл. 13 и 14 представлен дизайн исследования. Свежевосстановленный состав (50 мкл) инстиллировали внутрипузырно с использованием IV катетера 24G/3/4" и уретру окклюдировали с использованием кисетного шва. Состав держали в мочевом пузыре в течение 1 ч. Через 1 ч кисетный шов разрезали и мочевому пузырю позволяли опустошаться естественным путем. То же самое осуществляли в дни 0, 7, 14 и 21.

Результаты.

Животные, которым вводили пролипосомный состав паклитаксела (PLIP), демонстрировали снижение площади опухоли мочевого пузыря по сравнению с группой, которой вводили физиологический раствор. Из группы, которой вводили чистое лекарственное средство, выбыли шесть животных из-за чрезмерного воздействия лекарственного средства в растворенном состоянии (в DMSO), что могло привести к системной токсичности. На фиг. 8 представлены средние уровни в плазме, свидетельствующие о том, что лекарственное средство минимально попадало в системный кровоток в группах PLIP, в то время как чистое лекарственное средство, растворенное в DMSO, приводило к значительному уровню паклитаксела в плазме, что нежелательно для лечения рака мочевого пузыря. С учетом более низких доз исследовали более высокие дозы и сравнивали с зарегистрированным препаратом Abraxane®. Состав PLIP в дозе

10 мг/кг демонстрировал эффект, схожий с абраксаном в дозе 15 мг/кг. Повышение дозы состава PLIP приводило к некоторому снижению площади опухоли (фиг. 5, 6 и 7).

Таблица 13. Дизайн исследования 1

Группа	Средство	Доза	Схема	Путь	n
1	PLIP-001	0,5 мг/кг	Раз в неделю в течение 4 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
2	PLIP-001	2,5 мг/кг	Раз в неделю в течение 4 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
3	PLIP-001	5 мг/кг	Раз в неделю в течение 4 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
4	РТХ в DMSO	5 мг/кг	Раз в неделю в течение 4 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
5	Физиологический раствор	50 мкл	Раз в неделю в течение 4 недель	Внутрипузырная инстиляция	10

Таблица 14. Дизайн исследования 2

Группа	Средство	Доза	Схема	Путь	n
1	PLIP-001	10 мг/кг	Раз в неделю в течение 2 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
2	PLIP-001	15 мг/кг	Раз в неделю в течение 2 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
3	Абраксан	15 мг/кг	Раз в неделю в течение 2 недель	Внутрипузырная инстиляция	10
4	Физиологический раствор	50 мкл/мышь	Раз в неделю в течение 2 недель	Внутрипузырная инстиляция	10

Таблица 15. Конечная площадь опухоли в случае дизайна исследования 1 после четырех недель введения

Мышь	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)
ID	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1		60,44	19,07	18,82
2	26,36	39,05	1,81	0,90
3	26,03		19,96	43,51
4	2,15	28,46	20,04	51,95
5	19,71	32,07	1,25	
6	1,09	0,80	0,00	2,07
7	умерла	2,44	1,83	11,49
8	0,28	1,35	0,88	1,87
9	0,00	0,22	3,06	0,07
10	1,75	0,00	0,00	5,44
Среднее	9,67	18,31	6,79	15,12
SD	12,08	22,38	8,95	19,55

Таблица 16. Конечная гистологическая площадь опухоли в случае дизайна исследования 1 после четырех недель введения

	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)
Мышь	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
1	48,8*	0,04	6	0,75
2	6	0	0	1,2
3	1	0,04*	0,24	15,75
4		0	10	24
5	3*	0	0,04	3*
6	0,15	0,3	0,02	7
7	умерла	0,03	24,5*	70
8	0,09	0	0,05	12,25
9	0,06	0,3	8	6*
10	0,12	0,02	0	56
Среднее	1,236667	0,076667	2,705556	23,36875
SD	2,361039	0,127475	4,095452	25,89081

(В таблице символом * указана опухоль вне мочевого пузыря).

Таблица 17. Конечная площадь опухоли, измеряемая флуоресцентным способом, в случае дизайна исследования 2 после двух недель введения

	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)	Площадь опухоли (мм ²)
ID мыши	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
1	18,51	0,26	35,79		
2	35,11	20,92	28,62	15,96	
3	37,33		58,26		70,016
4	28,15	13,46	22,60		58,514
5	44,65	58,587		16,39	26,74
6		24,602	35,56		
7	6,39	55,401		5,37	58,7
8	2,27		1,60		
9			1,22		
10	22,08	9,69	16,44		0,51
Среднее	24,31	26,13	25,01	12,58	42,90
SD	14,93	22,51	19,05	6,24	28,66

Пример 10. У мышей в случае дизайна исследования 2 оценивали метастазы: группа 1 (10 мг/кг PLIP-001), группа 2 (15 мг/кг PLIP-001) и группа 3 (15 мг/кг абраксана). В табл. 18, 19 и 20 указана частота метастазирования в следующие органы: печень, брыжейку, диафрагму и почки.

Таблица 18. Метастазы в группе 1

ID животного	Группа 1 (PLIP 10 мг/кг)			
	Печень	Брыжейка	Диафрагма	Почки
1	√	√	√	
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Таблица 19. Метастазы в группе 2

ID животного	Группа 2 (PLIP 15 мг/кг)			
	Печень	Брыжейка	Диафрагма	Почки
1				
2				
3	√	√	√	
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Таблица 20. Метастазы в группе 3

ID животного	Группа 3 (15 мг/кг абраксана)				
	Печень	Брыжейка	Диафрагма	Селезенка	Средостение
1					
2					
3					
4	√	√			
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Таблица 21. Ответ на внутрипузырное введение в ортотопической модели на голых мышах Nude

Исследуемая группа	% мочевого пузыря с опухолью	% полных ответов	Гистологический размер опухоли, мм ²	Размер опухоли по результатам флуоресцентного анализа, мм ²	Разное
Группа 1 PLIP-001 10 мг/мл	10,7–21%	0%	1,24	9,67	EV #1; #7 умерла; #4 слишком маленькая; #2 EV?
Группа 2 PLIP-001 15 мг/мл	7,4%	40%	0,1	18,3	#3 EV
Группа 3 Абраксан 15 мг/мл	35,5%	20%	2,71	6,8	#7 EV; #10 и #2 нет захвата?
Группа 4 Физиологический раствор	82%	0%	23,4	15,1	#4 и #7 EV

(EV=внепузырное распространение, т.е. опухоль находится вне мочевого пузыря)

Пример 11.

Паклитаксел (PTX) является высокоактивным против метастазирующего рака мочевого пузыря, таким образом, PTX является потенциальным кандидатом для адъювантной внутрипузырной терапии для профилактики рецидивирования и прогрессирования NMIBC. PTX является липофильным. Существующие составы (например, таксол/абраксан) нерастворимы в, как правило, кислой внутрипузырной водной среде. При правильном составлении липофильные свойства PTX создают потенциал для проникновения через уротелий и доставки в подслизистую оболочку. Целями исследования являлась демонстрация успешного введения (с использованием липосом) PTX в мочевой пузырь и доказательства правильности концепции PLIP *in vitro* и *in vivo*.

Линии клеток рака мочевого пузыря человека (T24, KU7) использовали *in vitro* для оценки значений IC₅₀. Исследования *in vivo* осуществляли на голых мышах Nude, инокулированных линиями клеток KU7-GFP. После инокуляции опухоли мочевого пузыря KU7 осуществляли еженедельные (3 раза) внутрипузырные инстилляции (3 группы: PLIP; PTX/DMSO или PTX/Nab; или физиологический раствор) и измеряли рост опухоли. Фармакокинетические исследования осуществляли на крысах. Также осуществляли соответствующее GLP расширенное исследование острой токсичности/токсикокинетики на крысах. Осуществляли сравнительное исследование (PLIP по сравнению с абраксаном) *ex vivo* на модели мочевого пузыря свиньи и концентраций PTX в ткани.

Результаты исследования № 1: IC₅₀ в случае рака мочевого пузыря человека T24 составляла <0,01 для PLIP и >0,5 мкг/мл для состава PTX абраксана. PLIP являлся эффективным в значительном снижении размера опухоли и улучшении частоты полных ответов по сравнению с физиологическим раствором (фиг. 7/табл. 22). В случае PLIP наблюдали значительно сниженное системное воздействие PTX и более низкую смертность, чем в случае PTX/DMSO. В модели *ex vivo* выделенного мочевого пузыря свиньи PLIP (по сравнению с абраксаном) делал возможным лучший перенос паклитаксела из внутрипузырных липосом в уротелиальный и субуротелиальный слои мочевого пузыря без системного воздействия и связанной с ним токсичности. См. фиг. 9.

Таблица 22

Введение	% мочевого пузырей с опухолями	% полных ответов	Размер опухоли (мм ²)	Размер мочевого пузыря (мм ²)
Физиологический раствор	53%	0% (0/10)	6,74	23
PLIP-001 0,5 мг/кг	20%*	10% (1/10)	0,37	20
PLIP-001 2,5 мг/кг	6%*	56% (5/9)*	0,30	19
PLIP-001 5,0 мг/кг	4%*	56% (5/9)*	0,24	17
Паклитаксел 5,0 мг/кг (n=5)	10%*	25% (1/4)	0,05 ¹	13

(символом * в этой таблице указано статистически значимое различие с $p < 0,05$ по сравнению с физиологическим раствором-контролем)

Эти данные свидетельствуют о том, что PLIP стабилен в моче человека в условиях *vitro*, высокоактивен *in vitro* и *in vivo* против тестируемых линий клеток рака мочевого пузыря человека, и с помощью него можно вводить сравнительно большее количество РТХ в уротелиальные ткани, чем в случае абраксана, с незначительным системным уровнем РТХ.

Пример 12.

Исследования адгезии/слияния/транспорта *ex vivo* с использованием мочевого пузыря свиньи. Эксперимент: свежий мочевой пузырь свиньи получали на скотобойне (n=3) (самец) и дренировали любую оставшуюся мочу. Отделенный мочевой пузырь промывали холодным буфером Керба. Затем отделенный мочевой пузырь промывали и хранили в холодном буфере Тироде до начала эксперимента. Мочевой пузырь промывали 5 мл буфера Тироде (37°C) через уретру. Лиофилизированный PLIP и состав абраксана (6 мг) восстанавливали 5 мл буфера Тироде (37°C). Состав (5 мл) добавляли в мочевой пузырь через уретру. Сразу после добавления отбирали 0,5 мл вводимого состава для получения образца в нулевой момент времени (T0). Затем мочевой пузырь помещали в 150 мл буфера Тироде (37°C) на 2 ч в шейкере с водяной баней. Через 2 ч выпускали содержимое мочевого пузыря и получали образцы для анализа. Мочевой пузырь промывали 5 мл буфера Тироде (37°C) и собирали образцы для анализа (эту стадию осуществляли дважды). Разрезали мочевой пузырь и отрезали небольшие части (массой 1-2 г). Один фрагмент ткани использовали для получения срезов с помощью криомикротом. Криомикротомирование осуществляли при -15°C, срезы размером 10×50 мкм собирали в пробирки Eppendorf для выделения. Срезы отрезали до достижения мышечного слоя (из которого было слишком сложно получать срезы). Выделение срезов или целых фрагментов осуществляли с использованием метанола и анализировали способом ВЭЖХ, используемым для анализа состава. Результаты свидетельствовали о том, что PLIP мог проникать через уротелиальный слой и приводить к лучшей доставке лекарственного средства, чем абраксан (фиг. 9). Однако не обнаруживали лекарственное средство за пределами 2500 мкм от уротелиального слоя. Собственная пластинка находится на глубине 2500 мкм. Это является важным признаком изобретения, т.к. состав PLIP приводил к доставке паклитаксела до анатомической границы немuscularных слоев мочевого пузыря для профилактики роста опухоли, одновременно не демонстрируя какое-либо системное воздействие лекарственного средства.

Пример 13. Фармакокинетические исследования на самках крыс Спрег-Доули.

Осуществляли оценку профиля РК плазмы и концентрацию PLIP в мочевом пузыре по сравнению с Abraxane® после однократного внутривезикулярного введения в мочевой пузырь самок крыс Спрег-Доули. PLIP и абраксан вводили один раз в течение 2-часовой внутривезикулярной инстилляцией с последующим 24-часовым периодом наблюдения после введения дозы (табл. 23).

Таблица 23. Дизайн исследования внутривезикулярной РК на самках крыс SD

Группа	Средство	Общее количество инстилляций	Концентрация дозы (мг/мл)	Уровень дозы (мг/животное*)	Объем дозы (мл/животное)	n
1	PLIP-001	1	3	1,5	0,5	8
2	Abraxane®	1	3	1,5	0,5	8

* Целевая доза основана на средней массе тела приблизительно 0,300 кг/крысу.

Животным вводили PLIP или Abрахане® под анестезией изофлураном посредством медленной болюсной инстилляцией в мочевой пузырь с использованием уретрального внутривезикулярного катетера с последующим 2-часовым периодом удержания в мочевом пузыре. 2-часовой период воздействия основан на технической возможности и характерен для максимального объема дозы с учетом количества выделяемой мочи у крыс. В конце периода введения дозы/удержания дозу состава выпускали из мочевого пузыря посредством осторожной пальпации мочевого пузыря через брюшную стенку. В этом исследовании оценки включали проверки смертности и клинические наблюдения. Образцы плазмы для анализов РК собирали в день 1 в следующие моменты времени: до введения дозы и через 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч после начала инстилляций. В конце 24-часового периода получали мочевой пузырь и быстро замораживали для анализа концентрации паклитаксела.

Не наблюдали связанных с PLIP эффектов в отношении смертности или клинических наблюдений. Однократная внутривезикулярная инстилляцией PLIP при 2-часовом периоде удержания в концентрации 3 мг/мл (1,5 мг/животное) приводила к неопределимым уровням паклитаксела в плазме (нижний предел количественного определения [LLOQ]=1 нг/мл) у всех исследуемых животных. Схожие результаты получали в сравнительной группе Abрахане® при той же дозе (1,5 мг/животное), за исключением двух животных, в случае которых концентрации составляли 1,04 нг/мл через 2,17 ч после начала инстилляций и 1,76 нг/мл через 3 ч после начала инстилляций соответственно. Эти результаты подтверждают вывод о том, что PLIP не является системно биодоступным при введении внутривезикулярным путем в максимально допустимой дозе у крыс.

Результаты анализа ткани мочевого пузыря через 6 и 24 ч после начала инстилляций свидетельствовали о захвате паклитаксела в мочевом пузыре после введения PLIP или Abрахане®; однако через 6 ч в каждой исследуемой группе результаты варьировались. Концентрации паклитаксела в мочевом пузыре после 6 ч составляли приблизительно 300 нг/г у 1 из 4 животных, которым вводили PLIP, и 3 из 4 животных, которым вводили Abрахане®. В группе PLIP у одного животного была наименьшая концентрация паклитаксела в мочевом пузыре (приблизительно 40 нг/г) из всех исследуемых животных через 6 ч, в то время как у двух животных в этой группе наблюдали значения в диапазоне приблизительно 1800-1900 нг/г. В группе, которой вводили Abрахане®, одно животное имело концентрацию в мочевом пузыре приблизительно 8500 нг/г, в то время как значения у остальных трех животных составляли приблизительно 300 нг/г. Причина вариабельности данных, полученных через 6 ч, неизвестна, но это может быть связано с остаточной дозой состава, оставшейся в мочевом пузыре после механического массажа мочевого пузыря для выпуска инстиллята. Через 24 ч после начала инстилляций концентрации паклитаксела в мочевом пузыре были значительно ниже, чем через 6 ч, как можно было бы ожидать при способствовании мочеотделению для удаления остаточной дозы состава из внутренней поверхности мочевого пузыря, а также потенциальном метаболизме или дальнейшем распределении паклитаксела.

Таблица 24. Концентрация паклитаксела в мочевом пузыре in Vivo

	ID животного	Момент времени	Концентрация в нг/мл	Концентрация в нг/г
Группа 1 PLIP-001	1501	6 ч. после начала инстилляций	162	1782
	1503	6 ч. после начала инстилляций	170	1870
	1505	6 ч. после начала инстилляций	3,69	40,6
	1507	6 ч. после начала инстилляций	25,1	276,1
Группа 2 Abрахане®	2501	6 ч. после начала инстилляций	25,3	278,3
	2503	6 ч. после начала инстилляций	27,8	305,8
	2505	6 ч. после начала инстилляций	29,7	326,7
	2507	6 ч. после начала инстилляций	784	8624

Группа 1 PLIP-001	1502	24 ч. после начала инстилляций	BLQ<(1,00)	BLQ<(11,0)
	1504	24 ч. после начала инстилляций	BLQ<(1,00)	BLQ<(11,0)
	1506	24 ч. после начала инстилляций	1,25	13,8
	1508	24 ч. после начала инстилляций	1,23	13,5
Группа 2 Abraxane®	2502	24 ч. после начала инстилляций	3,43	37,7
	2504	24 ч. после начала инстилляций	2,63	28,9
	2506	24 ч. после начала инстилляций	2,12	23,3
	2508	24 ч. после начала инстилляций	2,98	32,8

Пример 14. Получение пролипосомного внутрипузырного состава цисплатина (PLIC) PLIC-002.

Получение PLIC-002 осуществляли посредством растворения 18,4 мг цисплатина в 15 мл воды. Водный раствор цисплатина при комнатной температуре комбинировали с 3 мл раствора этанола, содержащего липидные ингредиенты, указанные в табл. 25. Полученную дисперсию экстрадировали с использованием гомогенизатора EmuSiFlex®-C5. Экструзию осуществляли с использованием поликарбонатной мембраны с диаметром пор, уменьшающимся от 1 к 0,2 мкм. К конечному продукту экструзии примешивали 100 мг маннита и смесь лиофилизировали для получения пролипосом.

PLIC-002.

Таблица 25

Ингредиенты	Количество
Цисплатин (молекулярная масса=300 Да)	18,4 мг
DMPG (молекулярная масса=688,9 Да; T _c =23°C)	22 мг
DMPC (молекулярная масса=677,9 Да; T _c =24°C)	51 мг
Холестерин (молекулярная масса=386,65 Да)	16 мг
Маннит	100 мг

Пример 15. Получение PLIC-009.

Получение PLIC-009 осуществляли посредством растворения 9,8 мг цисплатина в 11 мл физиологического раствора. Водный раствор цисплатина при комнатной температуре комбинировали с 4 мл раствора этанола, содержащего липидные ингредиенты, указанные в табл. 26. Затем полученную дисперсию экстрадировали с использованием гомогенизатора EmuSiFlex™-C5. Экструзию осуществляли с использованием поликарбонатной мембраны с диаметром пор, уменьшающимся от 1 к 0,2 мкм. К конечному продукту экструзии примешивали 26 мг маннита и смесь лиофилизировали для получения пролипосом.

PLIC-009.

Таблица 26

Ингредиенты	Количество
Цисплатин	9,8 мг
DMPG	22,2 мг
DMPC	40,8 мг
Маннит	26 мг

Пример 16. Анализ in vitro эффективности пролипосомных составов цисплатина (CPN).

Подход на основе анализа сульфородамина В (SRB) использовали для определения ингибиторной концентрации IC₅₀ составов цисплатина PLIC-002 и PLIC-009 против линий клеток эпителиальной карциномы мочевого пузыря человека T24 (ATCC® HTB-4™), 5637 (ATCC® HTB-9™) и HT-1376 (ATCC® CRL-1472™). Для использования в анализах составы цисплатина повторно диспергировали в нормаль-

ном физиологическом растворе до концентрации 2 мг/мл цисплатина. Повторно диспергированные составы образовывали чистые растворы. Чистый раствор цисплатина 1 мг/мл в нормальном физиологическом растворе (несоставленный) использовали в качестве контроля. Более высокие концентрации чистого цисплатина не использовали, т.к. цисплатин не будет образовывать чистый раствор при концентрации выше 1 мг/мл в нормальном физиологическом растворе.

Клетки высевали на 96-луночные планшеты при плотности 5×10^3 клеток/лунку и культивировали в течение 24 ч. При 37°C и 5% CO₂. 2 мг/мл составов цисплатина и 1 мг/мл чистого лекарственного средства-контроля добавляли в среды высеянных культур клеток в количестве 100 мкл. Через 72 ч обработки составами среды аспирировали. Обработанные клетки фиксировали посредством осторожного добавления 100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты (ТКА) в каждую лунку и планшеты инкубировали при 4°C в течение по меньшей мере 1 ч. После инкубации планшеты пять раз промывали водопроводной водой, не допуская попадания струи воды непосредственно в лунки, планшеты сушили на воздухе при комнатной температуре и в каждую лунку добавляли 50 мкл 0,4% мас./об. SRB (в 1% уксусной кислоте). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в растворе SRB в течение от 20 до 30 мин. Затем планшеты пять раз промывали 1% уксусной кислотой и сушили на воздухе при комнатной температуре. Связанный с белком SRB определяли посредством добавления 100 мкл 10 мМ раствора Трис-основания в каждую лунку, позволяя раствору Трис солюбилизовать SRB в течение от 5 до 10 мин. Планшеты считывали с использованием микроспектрофотометра для чтения планшетов при 565 нм. В табл. 27 приведены значения IC₅₀ для PLIC-002, PLIC-009 и чистого раствора лекарственного средства.

Таблица 27

Состав	Линия клеток	IC ₅₀ (мкг/мл)
PLIC-002	T24	1,283
PLIC-002	5637	0,692
PLIC-002	HT1376	2,292
PLIC-009	T24	0,8658
PLIC-009	5637	0,394
PLIC-009	HT1376	Не тестировали
Чистое лекарственное средство	T24	0,788
Чистое лекарственное средство	5637	0,441
Чистое лекарственное средство	HT1376	1,11

Пример 27.

Анализ *in vitro* эффективности состава доцетаксела (DTL-102716).

Таблица 28

Ингредиенты	Количество
DMPC	8,6 мг
DMPG	3,4 мг
Доцетаксел безводный, USP	6 мг
Маннит	15 мг
Вода	1 мл

Тот же способ, описанный выше в примере 6, использовали для получения состава доцетаксела. Средний размер частиц (Z средн.) в составе составлял 380 нм. Подход на основе анализа сульфородамина В (SRB) *in vitro* использовали для определения ингибиторной концентрации IC₅₀ состава доцетаксела против линий клеток KU-7, как описано выше для паклитаксела. IC₅₀ состава доцетаксела составляла 0,0005 нг/мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пролипосомная порошкообразная дисперсия для лечения рака мочевого пузыря у пациента, состоящая из:

- (a) таксана,
 - (b) 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC),
 - (c) димиристоилфосфатидилглицерина натрия (DMPG)
- где массовые соотношения (a):(b):(c) составляют (1):(1,3-4,5):(0,4-2,5).

2. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по п.1, где таксан выбран из группы, состоящей из паклитаксела, доцетаксела, кабазитаксела, DJ-927 (тесетаксел), TPI 287, ларотаксела, ортатаксела, ДНА-

паклитаксела и их смеси.

3. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по п.2, где таксан представляет собой доцетаксел и массовые соотношения (а):(b):(с) составляют (1):(1,3-2):(0,4-2).

4. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по п.2, где таксан представляет собой паклитаксел и массовые соотношения (а):(b):(с) составляют (1):(1,3-3,8):(0,4-1,5).

5. Пролипосомная порошкообразная дисперсия по п.4, где массовые соотношения (а):(b):(с) составляют (1):(1,43):(0,57).

6. Фармацевтическая композиция для лечения рака мочевого пузыря у пациента, содержащая пролипосомную порошкообразную дисперсию по п.5 и крио/лиопротектор, выбранный из маннита, сахарозы, трегалозы и их комбинации.

7. Суспензия липосом для лечения рака мочевого пузыря у пациента, где липосомы состоят из:

(а) паклитаксела;

(b) 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC);

(с) димирситоилфосфатидилглицерина натрия (DMPG),

где массовые соотношения (а):(b):(с) составляют (1):(1,43):(0,57).

8. Суспензия липосом по п.7, где суспензия дополнительно содержит криопротектор.

9. Суспензия липосом по п.8, где криопротектор представляет собой маннит, сахарозу, трегалозу или их комбинацию.

10. Суспензия липосом по п.9, где криопротектор представляет собой маннит.

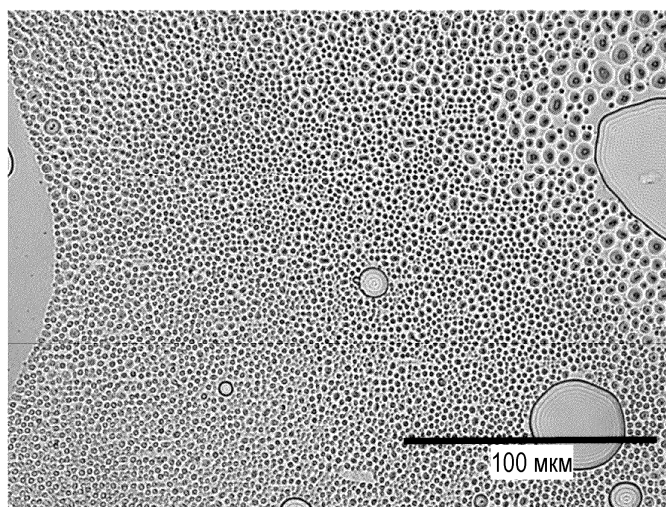
11. Суспензия липосом по п.10, где массовое соотношение пролипосомальной порошковой дисперсии и маннита составляет (1):(0,8).

12. Суспензия липосом по п.11, где липосомы суспендированы в стерильной воде или фармацевтически приемлемом водном растворе.

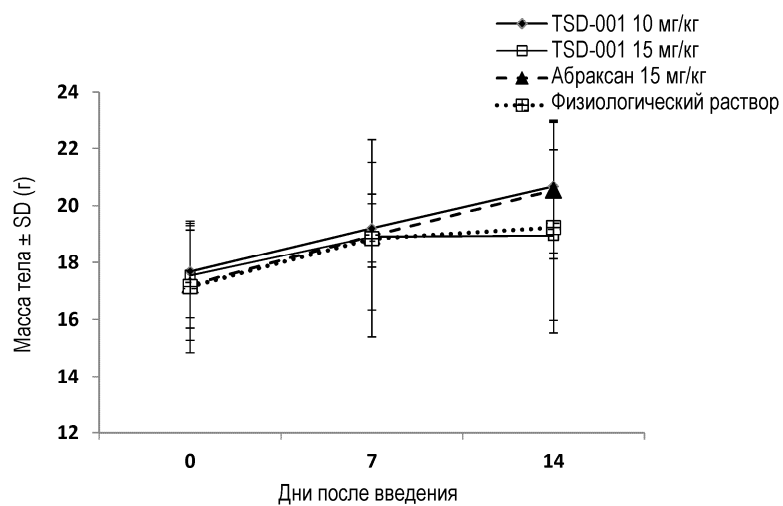
13. Суспензия липосом по любому из пп.7-12, где рак мочевого пузыря представляет собой немешечный инвазивный рак мочевого пузыря.

14. Суспензия липосом по любому из пп.7-12, где лекарственное средство таксан остается растворимым в мочевом пузыре при любом рН от 4,5 до 8.

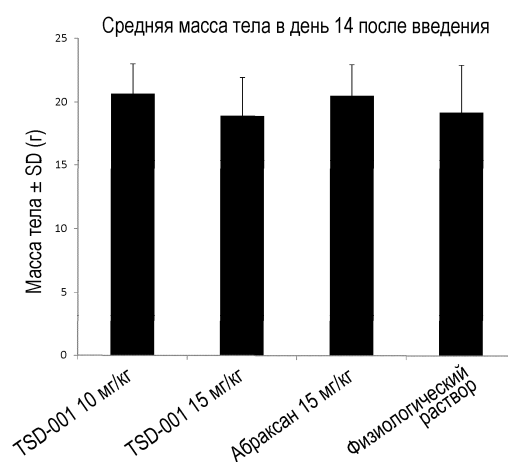
15. Суспензия липосом по любому из пп.7-12, где фармацевтическую композицию вводят в мочеточник и/или почечную лоханку.



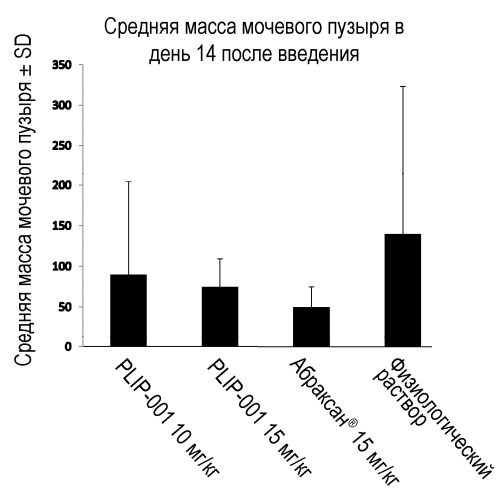
Фиг. 1



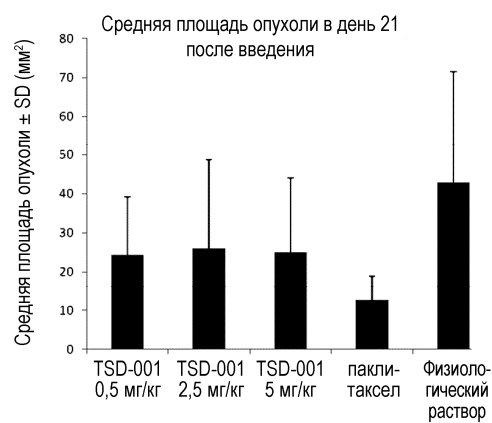
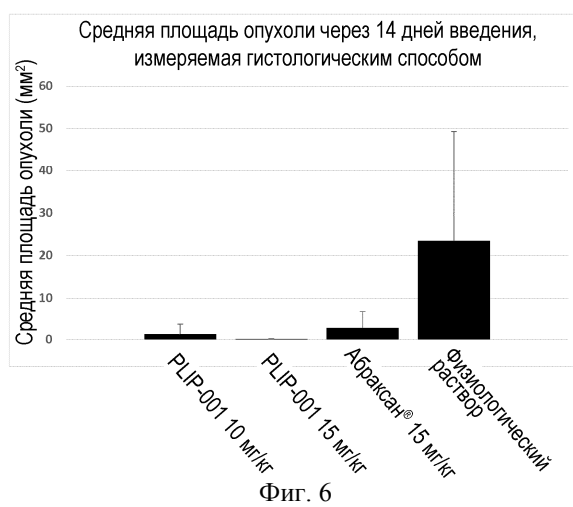
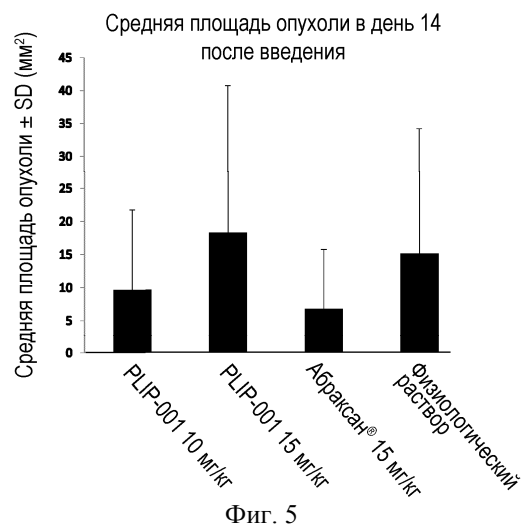
Фиг. 2

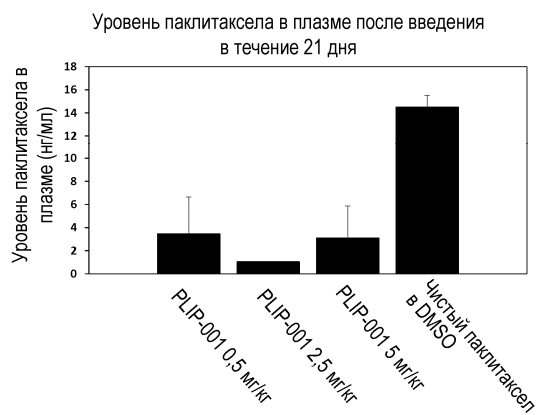


Фиг. 3

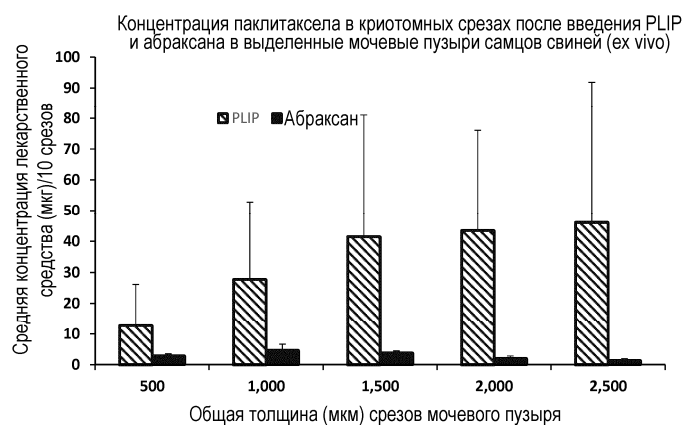


Фиг. 4





Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2