

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290446 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.19(22) Дата подачи заявки
2021.05.28(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО САПОНИНОМ ГЕМОЛИЗА, СОДЕРЖАЩАЯ КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ

(31) 10-2020-0080178

(32) 2020.06.30

(33) KR

(86) PCT/IB2021/054673

(87) WO 2022/003443 2022.01.06

(71) Заявитель:

АЙДЖИН ИНК. (KR)

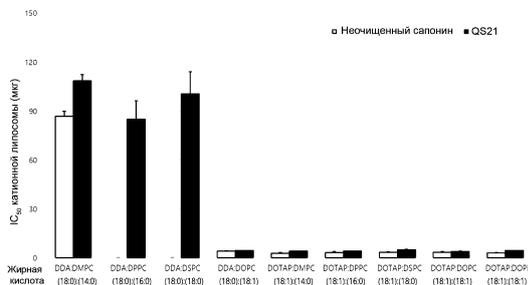
(72) Изобретатель:

Чо Ёан Чи, Ли На Кён, Ким Квансон,
Пак Син Э, Ан Соньюн (KR)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Раскрыта катионная липосома, обладающая эффектом ингибирования гемолиза эритроцитов, индуцированного сапонином. Более конкретно, раскрыта композиция для ингибирования индуцированного сапонином гемолиза эритроцитов, содержащая катионную липосому, содержащую ненасыщенный липид, композиция для усиления иммунитета и композиция для доставки лекарства, содержащая композицию для ингибирования индуцированного сапонином гемолиза эритроцитов, а также носитель для доставки лекарства и комплекс лекарственно-носитель, содержащий катионную липосому, содержащую ненасыщенный липид. Сапонин демонстрирует широкий спектр фармакологической и биологической активности, такой как противовоспалительная активность и т.д., включая сильную и эффективную иммунологическую активность, и, таким образом, эффективно используется в медицине и фармацевтике, однако, его недостатком является вызываемый им гемолиз эритроцитов. Хотя обычно сапонин используют совместно с холестерином и т.д. для ингибирования вызываемого сапонином гемолиза, здесь подтверждается, что индуцируемый сапонином гемолиз эритроцитов можно ингибировать с использованием катионных липосом, которые более эффективны и экономичны при ингибировании индуцируемого сапонином гемолиза. Таким образом, сапонин можно с большей пользой применять при производстве усилителей иммунитета, носителей для доставки лекарств и т.д.



A1

202290446

202290446

A1

КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО САПОНИНОМ ГЕМОЛИЗА, СОДЕРЖАЩАЯ КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ

Техническая область

Настоящее изобретение относится к катионным липосомам, обладающим эффектом ингибирования индуцированного сапонином гемолиза эритроцитов, и, более конкретно, к композиции для ингибирования индуцированного сапонином гемолиза эритроцитов, содержащей катионную липосому, содержащую ненасыщенный липид, к композиции для усиления иммунитета и к композиции для доставки лекарства, содержащей композицию для ингибирования индуцированного сапонином гемолиза эритроцитов и переносчика для доставки лекарства, а также к комплексу лекарство-переносчик, содержащему катионную липосому, содержащую ненасыщенный липид.

Уровень техники

Сапонин является гликозидным соединением, образующимся в качестве вторичного метаболита стероида и тритерпена. Сапонин демонстрирует широкий спектр фармакологической и биологической активности, такой как противовоспалительная активность и т.д., включая сильную и эффективную иммунологическую активность. В целом, о сапонине известно, что он обладает эффектом повышения иммунной функции, и сапонин используется в качестве адьюванта для вакцин или в качестве противоракового агента (Newman MJ, и соавт., *J. Immunol.* 148:2357-2362, 1992; Sun HX, и соавт., *Vaccine* 27: 1787-1796, 2009). Однако, сапонин индуцирует пенообразование и гемолитическое действие, причем термин «гемолитическое действие» означает, что эритроциты разрушаются и их содержимое (цитоплазма) поглощается окружающими липидами (например, плазмой), этот процесс называется гемолитической реакцией или просто гемолизом. Гемолиз происходит, потому что холестерин мембраны эритроцита сильно связывается с сапонином, что приводит к разрушению структуры мембраны.

Чтобы использовать сапонин для медицинских целей, необходимо ингибировать гемолиз эритроцитов под действием сапонины, и для этого обычно используют холестерин. Обычно при производстве лекарственных препаратов и подобного, холестерин, являющийся компонентом, получаемым из животных, подвергается жесткому контролю, и, чтобы преодолеть эту проблему, недавно разработали полусинтетический или синтетический холестерин и использовали при производстве лекарственных препаратов, но его недостатком является слишком высокая цена.

Технологии безопасной и эффективной доставки различных лекарств исследовали долгое время. Для поддержания активности без разрушения при производстве,

дистрибуции и т.д. используют технологию инкапсулирования. Эта технология способна минимизировать разрушение и потерю лекарственного препарата путем инкапсулирования лекарства в носитель, такой как липосома, и позволяет включать в него как гидрофильные, так и липофильные материалы. Капсульная композиция используется в качестве носителя для доставки лекарства и протектора в фармацевтике, используется для генной терапии и химиотерапии рака в фармацевтике, а также в качестве носителя для доставки эффективных компонентов и носителя для доставки воды в косметической области. Технологии инкапсулирования также могут играть роль при контроле скорости высвобождения и при хранении материала, содержащегося в стабильной фазе.

Липосома представляет собой самособирающуюся липидную бислойную структуру и является амфипатической молекулой, содержащей как гидрофобный, так и гидрофильный фрагмент. Липосома характеризуется отличной биосовместимостью, проста в производстве и преимущественно способна доставлять водорастворимые и жирорастворимые лекарства, так что в настоящее время продолжается тщательное исследование липосом как носителей при доставке лекарств, обладающих меньшим числом побочных эффектов в организме (Kwang Jae Cho, *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery* 2007;50(7): 562-572). Липосома химически стабильна, не обладает раздражающим эффектом, нетоксична и структурно подобна биоллипидным мембранам кожи. Кроме того, поскольку ее можно изготовить, меняя по-разному свойства поверхности, возможны различные пути ее использования в косметике, фармацевтике, при производстве адьювантов, систем доставки лекарств и в подобных отраслях.

С учетом этого уровня техники авторы настоящего изобретения предприняли значительные усилия для достижения ингибирования гемолиза, возникающего при введении сапонины в организм, что позволяет использовать терапевтическую эффективность и усиливающую иммунитет функцию сапонины, и убедились, что при смешивании сапонины с катионной липосомой, содержащей ненасыщенный катионный липид или нейтральный липид, явление гемолиза, возникающего при введении только одного сапонины, может быть эффективно ингибировано, что и выразилось в настоящем изобретении.

Информация, описанная в разделе уровня техники, предназначена только для улучшения понимания предпосылок создания изобретения, и ее не следует понимать как включающую информацию, формирующую предшествующий уровень техники, уже известный специалисту в той области техники, к которой принадлежит изобретение.

Краткое описание сущности изобретения

Объектом настоящего изобретения является предложение композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащей катионную липосому, которая обладает способностью ингибировать гемолиз эритроцитов сапонином.

Другим объектом настоящего изобретения является предложение способа ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащего введение композиции субъекту, применение композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином и применение композиции для приготовления терапевтического агента для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Еще одним объектом настоящего изобретения является предложение композиции для усиления иммунитета, содержащей композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Еще одним объектом настоящего изобретения является предложение способа усиления иммунитета, содержащего введение субъекту композиции для усиления иммунитета, применение композиции для усиления иммунитета с целью усиления иммунитета и применение композиции для усиления иммунитета для приготовления терапевтического агента для усиления иммунитета.

Еще одним объектом настоящего изобретения является предложение композиции для доставки лекарства, содержащей композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Еще одним объектом настоящего изобретения является предложение носителя для доставки лекарства, содержащего катионную липосому, которая содержит катионный липид и нейтральный липид, а также комплекс лекарство-носитель, в составе которого лекарство адсорбировано на или инкапсулировано в катионной липосоме, которая содержит катионный липид и нейтральный липид.

Для достижения описанных выше задач, в настоящем изобретении предлагается композиция для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащая катионную липосому, которая содержит катионный липид и нейтральный липид, а также сапонин.

Дополнительно, в настоящем изобретении предлагается способ ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащий введение субъекту композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, применение композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином с целью ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином и применение композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином для приготовления терапевтического агента для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Дополнительно, в настоящем изобретении предлагается композиция для усиления иммунитета, содержащая композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Дополнительно, в настоящем изобретении предлагается способ усиления иммунитета, содержащий введение субъекту композиции для усиления иммунитета, применение композиции для усиления иммунитета с целью усиления иммунитета, а также применение композиции для усиления иммунитета для приготовления терапевтического агента для усиления иммунитета.

Дополнительно, в настоящем изобретении предлагается композиция для доставки лекарства, содержащая композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Дополнительно, в настоящем изобретении предлагается носитель для доставки лекарства, содержащий катионную липосому, которая содержит катионный липид и нейтральный липид.

Дополнительно, в настоящем изобретении предлагается комплекс лекарство-носитель, в составе которого лекарство адсорбировано на или инкапсулировано в катионной липосоме, которая содержит катионный липид и нейтральный липид.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 и 2 представляют собой графики, демонстрирующие способность липосом ингибировать гемолиз, индуцированный неочищенным сапонином, в зависимости от их полярности.

Фиг. 3 и 4 представляют собой графики, демонстрирующие гемолиз эритроцитов (%) в зависимости от концентрации неочищенного сапонины и QS21, полученных из *Quillaja saponaria*.

Фиг. 5 - 13 представляют собой графики, демонстрирующие влияние липосом на ингибирование гемолиза под действием 2,5 мкг неочищенного сапонины и QS21.

Фиг. 14 представляет собой график, демонстрирующий влияние ингибирования индуцированного сапонином гемолиза, в зависимости от наличия или отсутствия ненасыщенных жирных кислот в катионном липиде или нейтральном липиде катионной липосомы.

Фиг. 15 представляет собой график, демонстрирующий цитотоксичность в зависимости от присутствия или отсутствия ненасыщенных жирных кислот в катионном липиде или нейтральном липиде в катионной липосоме.

Фиг. 16 представляет собой график, демонстрирующий гемолиз эритроцитов (%) в зависимости от концентрации стероидного сапонины.

Фиг. 17 - 20 представляют собой графики, демонстрирующие влияние липосом на

ингибирование гемолиза, индуцированного стероидным сапонином.

Фиг. 21 представляет собой график, демонстрирующий гемолиз эритроцитов (%) в зависимости от концентрации тритерпеноидного сапонины.

Фиг. 22 - 25 представляют собой графики, демонстрирующие влияние липосом на ингибирование гемолиза, индуцированного тритерпеноидным сапонином.

Фиг. 26 – 31 отображают результаты, подтверждающие влияние катионных липосом на ингибирование гемолиза, индуцированного сапонином, в зависимости от соотношения катионных и нейтральных липидов в катионной липосоме.

Подробное описание изобретения

Если не указано другое, все используемые здесь технические и научные термины имеют значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Обычно используемая здесь номенклатура и описанная ниже методика испытания хорошо известна специалисту в данной области техники и является типичной.

Липосомы классифицируют по-разному, в зависимости от свойств, таких как заряд поверхности, размер, мембранная структура и подобные. Например, заряд поверхности липосомы определяется сочетанием различных липидных материалов, таких как нейтральные липиды, катионные липиды, анионные липиды и т.д.

Согласно воплощению настоящего изобретения, разработана катионная липосома, способная ингибировать гемолиз эритроцитов сапонином, и подтверждено, что ее можно эффективно применять при производстве носителя для доставки лекарства, а также препарата для усиления иммунитета с использованием сапонины, даже без холестерина, который обычно применяют для подавления индуцированного сапонином гемолиза. Это позволяет рассчитывать на безопасное использование сапонины для медицинских и фармацевтических целей.

Соответственно, согласно одному аспекту, настоящее изобретение направлено на композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащую катионную липосому и сапонины, в которой катионная липосома содержит катионный липид и нейтральный липид.

Здесь термин «липид» включает жирную кислоту, фосфолипид, сложный эфир жирной кислоты, стероид и подобные вещества. Термин «ненасыщенный липид» означает липид, включающий по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод в составе цепи жирной кислоты липида.

Согласно настоящему изобретению, катионный липид или нейтральный липид может содержать по меньшей мере одну ненасыщенную жирную кислоту.

Согласно настоящему изобретению, катионный липид или нейтральный липид может содержать по меньшей мере одну цепь ненасыщенной жирной кислоты, и каждая цепь ненасыщенной жирной кислоты содержит от 10 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 14 до 18 атомов углерода, и число углерод-углеродных двойных связей в составе каждой цепи жирной кислоты находится в интервале от 1 до 6, предпочтительно 1.

Любой из катионного липида и нейтрального липида, входящих в состав композиции для ингибирования гемолиза в соответствии с настоящим изобретением, может быть ненасыщенным липидом, а оставшийся может быть ненасыщенным липидом или насыщенным липидом.

В соответствии с настоящим изобретением, катионный липид может быть выбран из группы, состоящей из следующих веществ: 1,2-диолеоил-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), диметилдиоктадециламмония бромид (DDA), 3β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерин (DC-Chol), 1,2-диолеоил-3-(диметиламмоний)пропан (DODAP), 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмоний пропан (DOTMA), 1,2-димиристолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (14:1 Этил PC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (16:0-18:1 Этил PC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (18:1 Этил PC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (18:0 Этил PC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (16:0 Этил PC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (14:0 Этил PC), 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (12:0 Этил PC), N1-[2-((1S)-1-[(3-аминопропил)амино]-4-[ди(3-аминопропил)амино]бутилкарбоксамидо)этил]-3,4-ди[олеилокси]-бензамид (MVL5), 1,2-димиристоил-3-диметиламмоний-пропан (14:0 DAP), 1,2-дипальмитоил-3-диметиламмоний-пропан (16:0 DAP), 1,2-дистеароил-3-диметиламмоний-пропан (18:0 DAP), N-(4-карбоксивензил)-N,N-диметил-2,3-бис(олеилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), 1,2-стеароил-3-триметиламмоний-пропан (18:0 TAP), 1,2-дипальмитоил-3-триметиламмоний-пропан (16:0 TA), 1,2-димиристоил-3-триметиламмоний-пропан (14:0 TAP), а также N4-холестерил-спермин (GL67).

Катионный липид может включать липид, в котором катионная функциональная группа введена в производное холестерина и т.д.

В соответствии с настоящим изобретением, нейтральный липид может быть выбран из группы, состоящей из следующих веществ: 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дилинолеоил-

sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилэтанолламин (PE), фосфатидилглицерин (PG), фосфорная кислота (PA), а также фосфатидилхолин (PC), но не ограничена ею.

Предпочтительно, катионный липид представляет собой DOTAP или DDA, а нейтральный липид представляет собой DMPC, DOPC, DOPE, DPPC или DSPC, но настоящее изобретение не ограничено ими.

В соответствии с настоящим изобретением, массовая доля (%) катионного липида в катионной липосоме может быть от 10 до 100%, но не ограничено этими значениями. В соответствии с настоящим изобретением, термин «массовая доля» имеет то же значение, что и «количество».

В соответствии с воплощением настоящего изобретения, можно подтвердить, что в составе катионной липосомы, которая ингибирует гемолиз сапонина, количество катионного липида DDA находится в интервале от 30% до 70%, а количество катионного липида DOTAP находится в интервале от 10% до 100%.

В соответствии с настоящим изобретением, липосома может дополнительно содержать гликолипид, а гликолипид может быть выбранным по меньшей мере из группы, состоящей из следующих веществ: дигалактозилдиглицерид, сложный эфир галактозилдиглицерида и серной кислоты, а также сфингогликолипиды, такие как галактозилцерамид, сложный эфир галактозилцерамида и серной кислоты, ластоцилцерамид, ганглиозид G7, ганглиозид G6, а также ганглиозид G4, но не ограничен ими.

Липосома может дополнительно содержать производное стерола, а производное стерола может быть выбранным по меньшей мере из группы, состоящей из следующих веществ: холестерин, дигидрохолестерин, эфир холестерина, фитостерол, ситостерол, стигмастерол, кампестерол, холестанол, ланостерол, 1-О-стеролглюкозид, 1-О-стеролмальтозид, а также 1-О-стеролгалактозид, но не ограничено ими.

Липосома может дополнительно содержать производное гликоля, а производное гликоля может быть выбранным по меньшей мере из группы, состоящей из следующих веществ: этилен гликоль, диэтилен гликоль, триэтилен гликоль, пропилен гликоль, дипропилен гликоль, триметилен гликоль, а также 1,4-бутандиол, но не обязательно ограничено ими.

Липосома может дополнительно содержать алифатический амин, а алифатический амин может быть выбранным по меньшей мере из группы, состоящей из следующих веществ: стеариламин, октиламин, олеиламин и линолеинамин, но не обязательно ограничен ими.

Способы производства липосом можно разделить на способы «сверху вниз», включающие образование больших липосом с последующим их разделением на меньшие по размеру липосомы, и способы «снизу вверх», включающие сборку небольших липосом с использованием липидных мономеров. Чтобы произвести липосомы по способу сверху вниз, выполняют растворение липида в органическом растворителе, удаление органического растворителя и регидратацию липида водным раствором.

Типичный способ производства липосомы может включать регидратацию пленки или гидратацию липида. При таком способе формируют LUV и затем их физически разрушают с использованием гомогенизатора, микрофлюидизатора или гомогенизатора высокого давления, получая в результате липосомы требуемого размера.

Катионную липосому по настоящему изобретению можно изготовить тонкослойным методом, методом инъекций или методом лиофильной сушки, но настоящее изобретение этими методами не ограничивается.

При выполнении тонкослойного метода липид растворяют в органическом растворителе и высушивают с образованием мембраны, которую затем прибавляют в раствор с образованием катионной липосомы, при выполнении метода инъекций содержащий липид органический растворитель выдавливают по каплям из шприца с образованием катионной липосомы, при выполнении лиофильной сушки липид растворяют в органическом растворителе, лиофильно высушивают, испаряя органический растворитель и затем регидратируют липид раствором с образованием катионной липосомы.

В соответствии с настоящим изобретением, полученную таким способом липосому можно (необязательно) лиофильно высушить для облегчения хранения. Для использования лиофилизат, бляшки или порошок, образующийся при лиофильной сушке липосомы, можно вводить после восстановления стерильной водой.

Липосомы, произведенные способом по настоящему изобретению, можно использовать для инъекции, трансдермальной доставки, трансназальной доставки и легочной доставки лекарства. Требуемые для такого препарата технологии и фармацевтически приемлемые носители, добавки и т.д. хорошо известны специалистам в фармацевтике. В этом отношении можно сделать ссылку на справочник Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

В соответствии с настоящим изобретением, сапонин можно адсорбировать на катионной липосоме за счет электростатического притяжения, но настоящее изобретение не ограничивается только таким способом. Альтернативно, сапонин может содержаться внутри катионной липосомы, или сапонин может связываться с липидной мембраной

катионной липосомы.

Здесь термин «адсорбировать» означает, что материал может быть связан с внутренней или внешней частью липосомы, и форма связывания особенно не ограничена, надо только, чтобы можно было эффективно доставить сапонин в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с настоящим изобретением, сапонин можно выбрать из группы, состоящей из гинзенозида Rb1, дигитонина, β -аэсцина, полученного из *Quillaja saponaria* неочищенного сапонина и его фракций, QS21, Quil A, QS7, QS18, QS17 и их солей, стероидного сапонина и тритерпеноидного сапонина, но не ограничен ими. Стероидный сапонин может включать дигитонин или Paris VII, а тритерпеноидный сапонин может включать аэсцин, α -хедерин, хедерагенин, эхиноцистиновую кислоту, хризантеллин А, хризантеллин В, байогенин, медакагеновую кислоту, маслиновую кислоту, олеанолиевую кислоту, эритродиол или азиатиковую кислоту. Предпочтительно, сапонин представляет собой полученный из *Quillaja saponaria* неочищенный сапонин, QS21, дигитонин, Paris VII, аэсцин или α -хедерин.

Композиция для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином в соответствии с настоящим изобретением может содержать только фармацевтически эффективное количество катионной липосомы или может дополнительно содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. «Фармацевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что соединение физиологически приемлемо и обычно не вызывает расстройств желудочно-кишечного тракта, аллергических реакций, таких как головокружение, или подобных реакций при введении людям.

Примеры носителя, вспомогательного вещества и разбавителя могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритриол, мальтитол, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, кальция фосфат, кальция силикат, целлюлозу, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, магния стеарат и минеральное масло. Более того, можно дополнительно включить наполнители, агенты против агломерации, лубриканты, увлажнители, ароматизаторы, эмульсификаторы и консерванты.

Композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином в соответствии с настоящим изобретением можно составлять, используя способы, известные в уровне техники, так чтобы получить быстрое, замедленное или отсроченное высвобождение

активного ингредиента после введения млекопитающим, отличающимся от человека. Лекарственные препараты могут быть в форме порошков, гранул, таблеток, эмульсий, сиропов, аэрозолей, мягких или твердых желатиновых капсул, стерильных растворов для инъекций, лиофилизированных порошков и стерильных порошков.

Композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином в соответствии с настоящим изобретением можно вводить различными маршрутами, включая оральное, трансдермальное, подкожное, внутривенное или внутримышечное введение, и дозировку активного ингредиента можно соответственно подобрать, в зависимости от различных факторов, таких как путь введения, возраст, пол и масса тела пациента, тяжесть заболевания и подобные.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на способ ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащий введение субъекту композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на применение композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином с целью ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на применение композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином для приготовления терапевтического агента для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

В соответствии с настоящим изобретением, в способе и применении используется описанная выше композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, и таким образом, описание, которое перекрывается с приведенным выше описанием композиции для ингибирования гемолиза по настоящему изобретению, можно опустить.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на композицию для усиления иммунитета, содержащую композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на способ усиления иммунитета, содержащий субъекту композиции для усиления иммунитета.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на применение композиции для усиления иммунитета с целью усиления иммунитета.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на применение композиции для усиления иммунитета для приготовления терапевтического агента для усиления иммунитета.

В соответствии с настоящим изобретением, композиция для усиления иммунитета,

способ усиления иммунитета и применение композиции для усиления иммунитета содержат описанную выше композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, и таким образом, описание, которое перекрывается с приведенным выше описанием композиции для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином по настоящему изобретению, можно опустить.

Здесь термин «усиление иммунитета» означает индуцирование начального иммунного ответа или измеримого повышения существующего иммунного ответа на антиген.

В соответствии с настоящим изобретением, композиция для усиления иммунитета может быть использована самостоятельно или совместно с адъювантом для образования фармацевтической композиции.

Адъювант может включать, например, элементы группы 2, выбранные из группы, состоящей из Mg, Ca, Sr, Ba и Ra или их солей; элементы группы 4, выбранные из группы, состоящей из Ti, Zr, Hf и Rf; соль алюминия или ее гидрат; или диметилпентадециламмония бромид. Соль можно получить, например, при помощи оксида, пероксида, гидроксида, карбоната, фосфата, пирофосфата, гидрофосфата, дигидрофосфата, сульфата и силиката.

Кроме того, адъювант может включать, например, агониста PRR (рецептор распознавания структур), выбранного из группы, состоящей из агониста TLR (Toll-подобный рецептор), агониста RLR (RIG-I-подобный рецептор) и агониста NLR (NOD-подобный рецептор).

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на композицию для доставки лекарства, содержащую композицию для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на носитель, доставляющий лекарство, содержащий катионную липосому, содержащую катионный липид и нейтральный липид.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение направлено на комплекс лекарство-носитель, в котором лекарство адсорбировано на или инкапсулировано в катионной липосоме, содержащей катионный липид и нейтральный липид.

В соответствии с настоящим изобретением, катионный липид или нейтральный липид могут содержать по меньшей мере одну ненасыщенную жирную кислоту.

В соответствии с настоящим изобретением, композиция для доставки лекарства, носитель, доставляющий лекарство и комплекс лекарство-носитель содержат катионную липосому, содержащую катионный липид и нейтральный липид, как описано выше, и

таким образом, описание, которое перекрывается с приведенным выше описанием катионной липосомы, содержащей катионный липид и нейтральный липид по настоящему изобретению, можно опустить.

В соответствии с настоящим изобретением, используемое лекарство ничем особо не ограничивается, при условии, что его возможно доставлять с использованием катионной липосомы в соответствии с настоящим изобретением, это может быть такое лекарство, как белок, ген, пептид, соединение, антиген или природный материал.

Композиция для усиления иммунитета или композиция для доставки лекарства в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать соответствующее вспомогательное вещество и разбавитель, как правило используемые при производстве фармацевтических композиций (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton PA). Более того, композицию можно приготовить в форме для оральной доставки, такой как порошки, гранулы, таблетки, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропы, аэрозоли и подобные, а можно приготовить в форме стерильного раствора для инъекций в соответствии с индивидуальными типичными методами.

Примеры носителя, вспомогательного вещества и разбавителя, которые можно включить в композицию для усиления иммунитета или композицию для доставки лекарства, могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, мальтит, крахмал, глицерин, гуммиарабик, альгинат, желатин, кальция фосфат, кальция силикат, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, магния стеарат и минеральное масло

Композицию можно приготовить, используя обычно применяемые разбавители и вспомогательные вещества, такие как наполнители, вещества для увеличения объема, связывающие вещества, увлажнители, разрыхлители, поверхностно активные вещества и т.д. Твердые препараты для орального введения могут включать таблетки, пилюли, порошки, гранулы, капсулы и т.д., и такие твердые препараты можно изготовить с использованием по меньшей мере одного вспомогательного вещества, например, крахмала, кальция карбоната, сахарозы, лактозы, желатина и т.д. В дополнение к простым вспомогательным веществам, можно также использовать лубриканты, такие как магния стеарат и тальк. В качестве жидкого препарата для орального введения можно использовать суспензии, внутренние растворы, эмульсии, сиропы и т.д. В дополнение к воде и жидкому парафину, которые являются обычно используемыми простыми разбавителями, можно включать различные вспомогательные вещества, такие как увлажнители, подсластители, ароматизаторы, консерванты и т.д. Препараты для

парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, неводные препараты, суспензии, эмульсии и лиофилизаты.

Для неводных препаратов и суспензий можно использовать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, пригодные для инъекционных препаратов сложные эфиры, такие как этилолеат, и подобные.

Дозировка композиции для усиления иммунитета или композиции для доставки лекарств в соответствии с настоящим изобретением может меняться в зависимости от возраста, пола, массы тела и т.д. субъекта, и дозировка может увеличиваться или уменьшаться, в зависимости от пути введения, тяжести заболевания, пола, массы тела, возраста и т.д.

Далее настоящее изобретение будет более подробно описано со ссылкой на примеры. Однако, специалисту в данной области техники очевидно, что эти примеры представлены только для иллюстрации настоящего изобретения, и не следует считать, что они ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Материалы

В таблице 1 ниже приведены липиды, используемые в качестве материалов для получения липосом, используемых в следующих примерах.

Таблица 1

ТИП ЛИПИДА		Жирная кислота	Заряд (pH 7,4)	Структура
Катионный липид	DDA (диметилдидециламмония бромид)	18:0	+1	
	DOTAP (1,2-диолеил-3-(триметиламмоний)пропан)	18:1	+1	
Нейтральный липид	DMPC (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин)	14:0	0	
	DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин)	16:0	0	
	DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин)	18:0	0	
	DOPC (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин)	18:1	0	
	DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин)	18:1	0	
Анионный липид	DMPG (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-гас-глицерин))	14:0	-1	

В таблице 1 (18:0), (18:1), (14:0), (16:0) и т.д. представляют степень насыщения соответствующих липидов, “N:0” означает полностью насыщенный липид и “N:1” означает липид, ненасыщенный в отношении 1 относительно N атомов углерода.

Источники липидов следующие:

Катионный липид: DOTAP (Merck), DDA (Sigma-Aldrich)

Нейтральный липид: DMPC (Corden Pharma), DOPC, DOPE, DSPC, DPPC (Avanti Polar Lipids)

Анионный липид: DMPG (Avanti Polar Lipids)

Пример 2. Сравнение способности липосомы ингибировать гемолиз под действием неочищенного сапонины, в зависимости от полярности липосом

Чтобы подтвердить способность липосомы ингибировать гемолиз под действием неочищенного сапонины, в зависимости от полярности липосом, катионные, нейтральные и анионные липосомы изготовили методом лиофильной сушки, после чего провели анализ гемолиза.

Пример 2-1. Производство липосом

Использованные в этом примере типы липосом показаны в таблице 2 ниже.

Таблица 2

№.	Липосома	Массовое отношение (%)	Конц. (мг/мл)
1	DDA:DOPC	50:50	2
2	DOPC	100	2
3	DMPG:DOPC	50:50	2

Показанные в таблице 2 липосомы изготовили следующим способом.

1) Взвесили по 40 мг DDA, DOPC и DMPG и поместили в стеклянный флакон вместимостью 70 мл.

2) В каждый флакон добавили по 20 мл трет-бутилового спирта, получив исходный раствор липида в концентрации 2 мг/мл, затем его нагревали на водяной бане при 65°C в течение 10 минут, тем самым полностью растворив липид.

3) Каждую липидную смесь приготовили, перемешав DDA, DOPC и DMPG в 10 мл стеклянном флаконе, как показано в таблице 3 ниже.

Таблица 3

DDA:DOPC		DOPC	DMPG:DOPC	
DDA	DOPC	DOPC	DMPG	DOPC
5 мл	5 мл	10 мл	5 мл	5 мл

4) Входное отверстие каждого флакона закрыли герметичной лентой, после чего 5 секунд перемешивали вихревым способом и в герметичной ленте иглой шприца проделали большое количество отверстий.

5) Смесь замораживали в морозильной камере при -70°C в течение 2 часов, после чего перенесли в лиофилизатор и подвергали лиофильной сушке при 20 Па и -80°C около 18 часов, испарив тем самым органический растворитель.

6) Полученный осадок из липосом хранили в замороженном виде до использования, и для использования в эксперименте гидратировали 10 мл раствора сахарозы в буфере HEPES (pH 7,4) на флакон.

Пример 2-2. Способ анализа гемолиза

1) Липосомы, сапонин, сахарозу в буфере HEPES (pH 7,4) и дистиллированную воду (D.W.) поместили в 96-луночный планшет, как показано в таблицах 4 и 5 ниже.

Таблица 4

С сапонином (концентрация липосом: 2 мг/мл, концентрация сапонины: 1 мг/мл)										
Группа	Конц. липосом (мкг/лунка)								100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0	10	20	40	50	60	80	100		
Липосомы (мкл)	0	5	10	20	25	30	40	50	0	0
Сапонин (мкл)	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0
Буфер (мкл)	90	85	80	70	65	60	50	40	0	100
D.W. (мкл)	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0

Таблица 5

Без сапонины										
Группа	Конц. липосом (мкг/лунка)								100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0	10	20	40	50	60	80	100		
Липосомы (мкл)	0	5	10	20	25	30	40	50	0	0
Сапонин (мкл)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Буфер (мкл)	90	85	80	70	65	60	50	40	0	100
D.W. (мкл)	10	10	10	10	10	10	10	10	100	0

2) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 30 минут с использованием орбитального шейкера.

3) 3 мл эритроцитов (RBC) суспендировали в 10 мл PBS и центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут, после чего удалили надосадочный раствор.

4) Этапы 2) и 3) повторили три раза, таким способом промыли эритроциты.

5) Осадок эритроцитов суспендировали в 1 мл PBS и разбавили в отношении 1/100, а затем подсчитали клетки.

6) С помощью PBS разбавили эритроциты до концентрации $1,5 \times 10^9$ клеток/мл и распределили в соотношении 3×10^7 клеток/20 мкл/лунка по лункам 96-луночного планшета, обработанного испытуемым материалом из пункта 2) выше.

7) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 1 часа с использованием орбитального шейкера.

8) 96-луночный планшет центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут.

9) 50 мкл надосадочного раствора перенесли в новый 96-луночный планшет и измерили оптическую плотность при длине волны 415 нм.

10) Гемолиз (%) рассчитали по следующему уравнению.

Гемолиз (%) = $(OD \text{ образца} - OD \text{ 0\% гемолиза}) / (OD \text{ 100\% гемолиза} - OD \text{ 0\% гемолиза}) \times 100$

Пример 2-3. Результаты анализа гемолиза

Влияние полярности липосомы на ингибирование гемолиза, индуцированного 10

мкг неочищенного сапонины, было подтверждено.

Показано, что нейтральные липосомы (DOPC) и анионные липосомы (DMPG:DOPC) не ингибировали гемолиз, индуцированный неочищенным сапонином (фиг. 1), в то время как 100 мкг катионных липосом (DDA:DOPC) на 85% ингибировал гемолиз, индуцированный неочищенным сапонином (фиг. 2).

Пример 3. Скрининг катионных липосом на предмет ингибирования гемолиза, индуцированного сапонином

Чтобы подтвердить влияние катионных липосом на ингибирование гемолиза, индуцированного сапонином, в зависимости от степени ненасыщенности катионных и нейтральных липидов, различные липосомы изготовили методом липидной пленки, после чего проанализировали их гемолиз и цитотоксичность (HaCaT, L6, J774A.1).

Пример 3-1. Производство липосом

Типы используемых в этом примере липосом показаны в таблице 6 ниже.

Таблица 6

№.	Липосома	Массовое отношение (%)	Конц. (мг/мл)
1	DDA:DMPC	50:50	2
2	DDA:DPPC		
3	DDA:DSPC		
4	DDA:DOPC		
5	DOTAP:DMPC	50:50	2
6	DOTAP:DPPC		
7	DOTAP:DSPC		
8	DOTAP:DOPC		
9	DOTAP:DOPE		

Показанные в таблице 6 липосомы изготовили следующим способом.

1) Взвесили катионный липид и нейтральный липид, и поместили их в стеклянную пробирку.

2) В нее прибавили хлороформ (Daejung), так чтобы концентрация липида была 2 мг/мл, а затем полностью растворили липиды при 37°C в течение 10 минут, получив раствор липида.

3) Каждую липидную смесь приготовили, перемешав в круглодонной колбе раствор катионного липида и нейтрального липида с массовым отношением 1:1.

4) Используя роторный испаритель, осуществили выпаривание в течение 30 минут при 60°C для липидной смеси, содержащей DOTAP, и при 80°C для липидной смеси, содержащей DDA, при этом следили, чтобы хлороформа в колбе не оставалось и липидная мембрана образовалась на стенке колбы.

5) В колбу поместили раствор сахарозы в буфере HEPES (pH 7,4), так чтобы концентрация липосомы составила 2 мг/мл, и липидная мембрана растворилась при 65°C.

б) Полученные таким способом липосомы распределили по 500 мкл в каждый стеклянный флакон, входное отверстие флакона закрыли резиновой пробкой, после чего поместили флакон в лиофилизатор (IIShinBioBase/Lyoph-pride10, SXX2), затем выполнили лиофильную сушку, как показано в таблице и ниже.

Таблица 7

Этап	Состояние	Температура (°C)	Время (ч)	Степень вакуума (мТор)
1	Предварительное замораживание	-40	2	999
2	Поддержание температуры	-40	27	50
3	Повышение температуры	-20	10	50
4	Поддержание температуры	-20	2	50
5	Повышение температуры	20	10	50
6	Поддержание температуры	20	13	50

7) Полученные таким способом липосомы хранили в холодильнике при 4°C до анализа.

Пример 3-2. Способ анализа гемолиза

1) После лиофильной сушки хранящиеся в стеклянном флаконе липосомы гидратировали 225 мкл дистиллированной воды, затем реакция продолжалась при 60°C в течение 10 минут, в результате липосомы полностью растворились.

2) Липосомы, сапонин, сахарозу в буфере HEPES (pH 7,4) и дистиллированную воду поместили в 96-луночный планшет, как показано в таблицах 8 и 9 ниже.

Таблица 8

С сапонином (концентрация липосом: 4,4 мг/мл, концентрация сапонины: 0,25 мг/мл)										
Группа	Конц. липосом (мкг/луночка)								100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0	2	3	6	13	25	50	100		
Липосомы (мкл)	0,0	0,4	0,7	1,4	2,8	5,6	11,3	22,5	0	0
Сапонин (мкл)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0	0
Буфер (мкл)	100,0	99,6	99,3	98,6	97,2	94,4	88,8	77,5	0	110
D.W. (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	110	0

Таблица 9

Без сапонины										
Группа	Конц. липосом (мкг/луночка)								100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0	2	3	6	13	25	50	100		
Липосомы (мкл)	0,0	0,4	0,7	1,4	2,8	5,6	11,3	22,5	0	0
Сапонин (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
Буфер (мкл)	100,0	99,6	99,3	98,6	97,2	94,4	88,8	77,5	0	110
D.W. (мкл)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	110	0

3) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 30 минут с использованием орбитального шейкера.

4) 3 мл RBC суспендировали в 10 мл PBS и центрифугировали при комнатной

температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут, после чего удалили надосадочный раствор.

5) Этапы 3) и 4) повторили три раза, таким способом промыли эритроциты.

6) Осадок эритроцитов суспендировали в 1 мл PBS и разбавили в отношении 1/100, а затем подсчитали клетки.

7) С помощью PBS разбавили эритроциты до концентрации $1,5 \times 10^9$ клеток/мл и распределили в соотношении 3×10^7 клеток/20 мкл/лунка по лункам 96-луночного планшета, обработанного испытуемым материалом из пункта 2) выше.

8) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 1 часа с использованием орбитального шейкера.

9) 96-луночный планшет центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут.

10) 50 мкл надосадочного раствора перенесли в новый 96-луночный планшет и измерили оптическую плотность при длине волны 415 нм.

11) Гемолиз (%) рассчитали по следующему уравнению.

Гемолиз (%) = $(OD \text{ образца} - OD \text{ 0\% гемолиза}) / (OD \text{ 100\% гемолиза} - OD \text{ 0\% гемолиза}) \times 100$

Пример 3-3. Подтверждение гемолитической концентрации сапонины

На основании результатов подтверждения зависимости гемолиза от концентрации в случае полученного из *Quillaja saponaria* неочищенного сапонины (VET-SAP[®], Desert King) и QS21 (Desert King), 100% гемолиз наблюдали, когда количество неочищенного сапонины было 2,5 мкг или когда количество QS21 было 2,5 мкг (фиг. 3 и 4).

Пример 3-4. Подтверждение влияния катионных липосом на ингибирование гемолиза, индуцированного сапонином

Определили тип и концентрацию катионных липосом, которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг неочищенного сапонины или QS21.

В результате обнаружено, что DDA:DMPC, DDA:DPPC и DDA:DSPC не ингибируют гемолиз, индуцированный неочищенным сапонином или QS21 до 100% (фиг. 5 – 7). С другой стороны, индуцированный неочищенным сапонином или QS21 гемолиз был на 100% ингибирован при использовании 25 мкг DDA:DOPC (липосомы:сапонин – 10:1), 50 мкг DOTAP:DMPC (липосомы:сапонин – 20:1), 50 мкг DOTAP:DPPC (липосомы:сапонин 20:1), 50 мкг DOTAP:DSPC (липосомы:сапонин – 20:1), 25 мкг DOTAP:DOPC (липосомы:сапонин – 10:1) или 12,5 мкг DOTAP:DOPE (липосомы:сапонин – 5:1) (фиг. 8-13).

Дополнительно, количество катионных липосом, ингибирующих гемолиз, индуцированный 2,5 мкг неочищенного сапонины или QS21, подтвердили с

использованием показателя IC₅₀ (концентрация липосом, которая ингибирует гемолиз на 50%) и IC₁₀₀ (концентрация липосом, которая ингибирует гемолиз на 100%) (таблица 10 и 11).

Таблица 10

Катионные липосомы			Количество катионных липосом, которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг неочищенного сапонины (мкг)	
Тип	Липид		IC ₅₀	IC ₁₀₀
	Катионный	Нейтральный		
DDA:DMPC	18:0	14:0	199,9	-
DDA:DPPC	18:0	16:0	-	-
DDA:DSPC	18:0	18:0	-	-
DDA:DOPC	18:0	18:1	4,4	25,0
DOTAP:DMPC	18:1	14:0	2,8	50,0
DOTAP:DPPC	18:1	16:0	2,7	50,0
DOTAP:DSPC	18:1	18:0	3,3	50,0
DOTAP:DOPC	18:1	18:1	3,3	25,0
DOTAP:DOPE	18:1	18:1	2,9	12,5

Таблица 11

Катионные липосомы			Количество катионных липосом, которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг QS21 (мкг)	
Тип	Липид		IC ₅₀	IC ₁₀₀
	Катионный	Нейтральный		
DDA:DMPC	18:0	14:0	74,4	-
DDA:DPPC	18:0	16:0	75,5	-
DDA:DSPC	18:0	18:0	53,9	-
DDA:DOPC	18:0	18:1	4,4	25,0
DOTAP:DMPC	18:1	14:0	3,8	50,0
DOTAP:DPPC	18:1	16:0	3,9	50,0
DOTAP:DSPC	18:1	18:0	4,8	50,0
DOTAP:DOPC	18:1	18:1	3,8	25,0
DOTAP:DOPE	18:1	18:1	4,3	12,5

Таким образом, подтверждено, что в отличие от нейтральных липосом, содержащих только нейтральные липиды, катионные липосомы, содержащие катионные липиды, проявляют активность по ингибированию гемолиза, и активность липосом по ингибированию гемолиза в значительной степени варьировалась в зависимости от сочетания степеней насыщения липидов, содержащихся в катионных липосомах. Конкретно, можно подтвердить, что чем выше количество ненасыщенной жирной кислоты в катионной липосоме, тем лучше выражен эффект ингибирования гемолиза, индуцированного сапонином (фиг. 14).

Пример 4. Анализ цитотоксичности липосом

Пример 4-1. Способ анализа

1) Клетки HaCaT (кератиноциты человека) (DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, 1% пенициллина-стрептомицина) культивировали в инкубаторе при

37°C и 5% CO₂.

2) Когда клетки достигли 80-90% конfluence на чашке 100 мм, клеточную культуру извлекли отсасыванием, и клетки промыли 5 мл PBS.

3) 5 мл раствора трипсин-ЭДТА перенесли в 100 мм чашку и оставили реагировать при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 – 6 минут, после чего добавили 5 мл клеточной культуральной среды и перенесли суспензию клеток в пробирку вместимостью 15 мл, которую затем 3 минуты центрифугировали при 1500 об/мин и комнатной температуре, после чего удалили надосадочный раствор.

4) Клетки суспендировали в 10 мл PBS и 3 минуты центрифугировали при 1500 об/мин и комнатной температуре, после чего удалили надосадочный раствор.

5) Описанные выше этапы повторили два раза, таким образом, клетки промыли.

6) К полученным таким способом клеткам прибавили 3 мл клеточной культуральной среды для их суспендирования, после чего пересчитали клетки, определив их количество и жизнеспособность окрашиванием трипановым синим.

7) Подтвердили, что жизнеспособность клеток составляла 85% или больше, после чего, суспензию клеток довели до концентрации 1×10^5 клеток/мл культуральной средой, распределили по 100 мкл/лунка в 96-луночный планшет и культивировали 24 часа при 37°C и 5% CO₂.

8) После завершения лиофильной сушки липосомы, сохраняемые в стеклянном флаконе, гидратировали 225 мкл дистиллированной воды и оставили на 10 минут при 60°C, чтобы липосомы полностью растворились (концентрация липосом 4,4 мг/мл).

9) 22,5 мкл липосом, 10 мкл сапонины (0,25 мг/мл) и 67,5 мкл буфера перемешали в 96-луночном планшете и оставили реагировать на 30 минут при комнатной температуре в орбитальном шейкере при 300 об/мин.

10) Смесь липосом и сапонины распределили в концентрации 20 мкл/лунка в 96-луночном планшете и культивировали 18 часов при 37°C и 5% CO₂.

11) Ez-Cytox и клеточную культуральную среду смешали в отношении 7:3, распределили в концентрации 50 мкл/лунка в 24-луночном планшете и оставили реагировать на 3 часа при 37°C и 5% CO₂.

12) 96-луночный планшет центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут.

13) 100 мкл надосадочного раствора перенесли в новый 96-луночный планшет и измерили оптическую плотность при длине волны 450 нм.

14) Цитотоксичность (%) рассчитали по следующему уравнению.

$$\text{Цитотоксичность (\%)} = 100 - [(\text{OD образца}/\text{OD буфера}) \times 100]$$

Пример 4-2. Результаты

Как показано на фиг. 15, чем выше количество ненасыщенной жирной кислоты в катионной липосоме, тем меньше цитотоксичность.

На основании сочетания этих результатов и результатов примера 3 можно подтвердить, что использование катионных липосом, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, показало низкую цитотоксичность и способно на 100% ингибировать гемолиз, индуцированный сапонином.

Пример 5. Скрининг ингибирования гемолиза, индуцированного различными сапонинами

Влияние катионных липосом на ингибирование индуцированного сапонином гемолиза оценили с использованием различных сапонинов, отличающихся от полученного из *Quillaja saponaria* неочищенного сапонины и QS21.

Пример 5-1. Метод

Различные липосомы получили методом липидной пленки и выполнили анализ гемолиза.

Типы использованных в этом примере сапонины и катионной липосомы показаны в следующих таблицах 12 и 13, соответственно.

Таблица 12

Сапонин		
Классификация	Тип	Количество (мкг)
Стероидный сапонин	Дигитонин	2,5
	Paris VII	1,25
Тритерпеноидный сапонин	Аэсцин	2,5
	α -Хедерин	1,25

Из количеств, указанных в таблице 12, выбрали концентрацию сапонины, вызывающего 60% гемолиз, по причине наличия лимита количества липосом, которое можно использовать.

Таблица 13

Катионная липосома			
Тип	Липид		Количество (мкг)
	Катионный	Нейтральный	
DDA:DMPC	18:0	14:0	400, 200, 100, 50, 25, 13, 6, 0
DDA:DOPC	18:0	18:1	
DOTAP:DMPC	18:1	14:0	400, 200, 100, 50, 25, 13, 6, 0
DOTAP:DOPC	18:1	18:1	

Пример 5-2. Производство липосом

Использованные в этом примере липосомы получили следующим способом.

1) Взвесили катионный липид и нейтральный липид и поместили их в стеклянную пробирку.

2) В нее добавили хлороформ, так чтобы концентрация липида была 4 мг/мл, а затем полностью растворили содержимое при 37°C в течение 10 минут, получив раствор липида.

3) Каждую липидную смесь приготовили, перемешав в круглодонной колбе раствор катионного липида и нейтрального липида с отношением масс 1:1.

4) Используя роторный испаритель, осуществили выпаривание в течение 30 минут при 60°C для липидной смеси, содержащей DOTAP, и при 80°C для липидной смеси, содержащей DDA, при этом следили, чтобы хлороформа в колбе не оставалось и липидная мембрана образовалась на стенке колбы.

5) В колбу поместили раствор сахарозы в буфере HEPES (pH 7,4), так чтобы концентрация липосомы составила 4 мг/мл, и липидную мембрану растворили при 60°C.

6) Полученные таким способом липосомы хранили в холодильнике до анализа.

Пример 5-3. Способ анализа гемолиза

1) Липосомы, сапонин, сахарозу в буфере HEPES (pH 7,4) и дистиллированную воду поместили в 96-луночный планшет, как показано в таблицах 14 и 15 ниже

Таблица 14

С сапонином (концентрация липосом: 4 мг/мл, концентрация сапонаина (дигитонин 0,25 мг/мл, Paris VII: 0,125 мг/мл, аэсцин: 0,25 мг/мл, α-хедерин: 0,125 мг/мл))											
Группа	Конц. липосом (мкг/лунка)									100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0	3	6	13	25	50	100	200	400		
Липосомы (мкл)	0,0	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0	0	0
Сапонин (мкл)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0	0
Буфер (мкл)	100,0	99,2	98,4	96,9	93,8	87,5	75,0	50,0	0,0	0	110
D.W. (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	110	0

Таблица 15

Без сапонаина											
Группа	Конц. липосом (мкг/лунка)									100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0	3	6	13	25	50	100	200	400		
Липосомы (мкл)	0,0	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	22,5	0	0
Сапонин (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
Буфер (мкл)	100,0	99,2	98,4	96,9	93,8	87,5	75,0	50,0	77,5	0	110
D.W. (мкл)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	110	0

2) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 30 минут с использованием орбитального шейкера

3) 3 мл RBC суспендировали в 10 мл PBS и центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут, после чего удалили надосадочный раствор.

4) Этапы 2) и 3) повторили три раза, таким способом промыли эритроциты

5) Осадок эритроцитов суспендировали в 1 мл PBS и разбавили в отношении 1/100, а затем подсчитали клетки

6) С помощью PBS разбавили эритроциты до концентрации $1,5 \times 10^9$ клеток/мл и распределили в соотношении 3×10^7 клеток/20 мкл/лунка по лункам 96-луночного планшета, обработанного испытуемым материалом из пункта 2) выше.

7) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 1 часа с использованием орбитального шейкера

8) 96-луночный планшет центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут.

9) 50 мкл надосадочного раствора перенесли в новый 96-луночный планшет и измерили оптическую плотность при длине волны 415 нм.

10) Гемолиз (%) рассчитали по следующему уравнению.

Гемолиз (%) = $(OD \text{ образца} - OD \text{ 0\% гемолиза}) / (OD \text{ 100\% гемолиза} - OD \text{ 0\% гемолиза}) \times 100$

Пример 5-4. Подтверждение эффекта ингибирования гемолиза, индуцированного стероидным сапонином

На основании результатов измерения вызывающей 100% гемолиз концентрации дигитонина или Paris VII, 100% гемолиз наблюдали, когда количество дигитонина составляло 10 мкг или когда количество Paris VII составляло 5 мкг, и 60% гемолиз наблюдали, когда количество дигитонина составляло 2,5 мкг или когда количество Paris VII составляло 1,25 мкг (фиг. 16).

Соответственно, на основании результатов измерения концентраций DDA(18:0):DMPC(14:0) и DDA(18:0):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг дигитонина, DDA:DMPC не ингибирует гемолиз, индуцированный дигитонином, но гемолиз, индуцированный дигитонином, был ингибирован на 100%, если количество DDA:DOPC составляло 400 мкг (липосома:сапонин – 160:1) (фиг. 17).

На основании результатов измерения концентраций DOTAP(18:1):DMPC(14:0) и DOTAP(18:1):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг дигитонина, гемолиз, индуцированный дигитонином, был ингибирован на 100%, если количество DOTAP:DMPC составляло 400 мкг (липосома:сапонин – 160:1), и гемолиз,

индуцированный дигитонином, был ингибирован на 100%, если количество DOTAP:DOPC составляло 200 мкг (липосома:сапонин – 80:1) (фиг. 18).

Дополнительно, на основании результатов измерения концентраций DDA(18:0):DMPC(14:0) и DDA(18:0):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 1,25 мкг Paris VII, DDA:DMPC не ингибировал гемолиз, индуцированный Paris VII, и гемолиз, индуцированный Paris VII, был ингибирован на 50%, если количество DDA:DOPC составляло 400 мкг (фиг. 19).

На основании результатов измерения концентраций DOTAP(18:1):DMPC(14:0) и DOTAP(18:1):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 1,25 мкг Paris VII, гемолиз, индуцированный Paris VII, был ингибирован на 100%, если количество DOTAP:DMPC составляло 400 мкг (липосома:сапонин – 320:1), и гемолиз, индуцированный Paris VII, был ингибирован на 100%, если количество DOTAP:DOPC составляло 400 мкг (фиг. 20).

Пример 5-5. Подтверждение эффекта ингибирования гемолиза, индуцированного тритерпеноидным сапонином

На основании результатов измерения вызывающей 100% гемолиз концентрации аэсцина или α -хедерина, 100% гемолиз наблюдали, когда количество аэсцина составляло 5 мкг или когда количество α -хедерина составляло 10 мкг, и 60% гемолиз наблюдали, когда количество аэсцина составляло 2,5 мкг или когда количество α -хедерина составляло 1,25 мкг (фиг. 21).

Соответственно, на основании результатов измерения концентраций DDA(18:0):DMPC(14:0) и DDA(18:0):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг аэсцина, DDA:DMPC не ингибирует гемолиз, индуцированный аэсцином, но гемолиз, индуцированный аэсцином, был ингибирован на 100%, если количество DDA:DOPC составляло 400 мкг (липосома:сапонин – 160:1) (фиг. 22).

На основании результатов измерения концентраций DOTAP(18:1):DMPC(14:0) и DOTAP(18:1):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 2,5 мкг аэсцина, гемолиз, индуцированный аэсцином, был ингибирован на 100%, если количество каждого из DOTAP:DMPC и DOTAP:DOPC составляло 200 мкг (липосома:сапонин – 80:1) (фиг. 23).

Дополнительно, на основании результатов измерения концентраций DDA(18:0):DMPC(14:0) и DDA(18:0):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 1,25 мкг α -хедерина, DDA:DMPC не ингибировал гемолиз, индуцированный α -хедерином, и гемолиз, индуцированный α -хедерином, был

ингибирован на 100%, если количество DDA:DOPC составляло 13 мкг (липосома:сапонин – 10,4:1) (фиг. 24).

На основании результатов измерения концентраций DOTAP(18:1):DMPC(14:0) и DOTAP(18:1):DOPC(18:1), которые ингибируют гемолиз, индуцированный 1,25 мкг α -хедерина, гемолиз, индуцированный α -хедерином, был ингибирован на 100%, если количество каждого из DOTAP:DMPC и DOTAP:DOPC составляло 13 мкг (липосома:сапонин – 10,4:1) (фиг. 25).

Пример 5-6. Результаты

Количество липосом, ингибирующих гемолиз, индуцированный различными сапонинами, показано в таблице 16 ниже.

Таблица 16

Тип	Липосома		Стероидный сапонин				Тритерпеноидный сапонин			
	Липид		Дигитонин		Paris VII		Аэсцин		α -Хедерин	
	Катионный	Нейтральный	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀
DDA:DMPC	18:0	14:0	-	-	-	-	-	-	-	-
DDA:DOPC	18:0	18:1	198,9	400,0	256,2	-	222,5	400,0	8,3	12,5
DOTAP:DMPC	18:1	14:0	105,4	400,0	219,8	400,0	88,9	200,0	7,5	12,5
DOTAP:DOPC	18:1	18:1	64,4	200,0	188,3	400,0	66,1	200,0	6,1	12,5

IC₅₀: Концентрация липосомы, ингибирующая гемолиз на 50%.

IC₁₀₀: Концентрация липосомы, ингибирующая гемолиз на 100%.

Как понятно из описанных выше результатов, можно подтвердить, что, если катионная липосома содержит ненасыщенную жирную кислоту, ее влияние на ингибирование индуцированного сапонином гемолиза очень велико.

Пример 6. Подтверждение соотношения катионного и нейтрального липидов в катионной липосоме, которое ингибирует гемолиз, индуцированный сапонином

Чтобы подтвердить соотношение катионного липида и нейтрального липида в составе катионной липосомы, которая ингибирует индуцированный сапонином гемолиз, методом лиофильной сушки получили катионные липосомы с различными соотношениями катионного липида и нейтрального липида, и выполнили анализ гемолиза.

Пример 6-1. Производство липосом

Типы используемых в этом примере липосом показаны в таблице 17 ниже.

Таблица 17

No.	Липосома	Массовое отношение (%)	Конц. (мг/мл)
1	DDA:DOPC	0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0	2
2	DOTAP:DMPC		2
3	DOTAP:DOPC		2

Показанные в таблице 17 липосомы изготовили следующим способом.

Буфер (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	110
D.W. (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	110	0

Таблица 20

Без сапонина													
Группа	Липосома (катионный липид:нейтральный липид)											100% Контроль гемолиза	0% Контроль гемолиза
	0:100	10:90	20:80	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30	80:20	90:10	100:0		
Липосомы (мкл)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0	0
Сапонин (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
Буфер (мкл)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	110
D.W. (мкл)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	110	0

2) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 30 минут с использованием орбитального шейкера.

3) 3 мл RBC суспендировали в 10 мл PBS и центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут, после чего удалили надосадочный раствор

4) Этапы 2) и 3) повторили три раза, таким способом промыли эритроциты.

5) Осадок эритроцитов суспендировали в 1 мл PBS и разбавили в отношении 1/100, а затем подсчитали клетки.

6) С помощью PBS разбавили эритроциты до концентрации $1,5 \times 10^9$ клеток/мл и распределили в соотношении 3×10^7 клеток/20 мкл/лунка по лункам 96-луночного планшета, обработанного испытуемым материалом из пункта 2) выше

7) Реакцию провели при комнатной температуре и 300 об/мин в течение 1 часа с использованием орбитального шейкера.

8) 96-луночный планшет центрифугировали при комнатной температуре и 1500 об/мин в течение 5 минут

9) 50 мкл надосадочного раствора перенесли в новый 96-луночный планшет и измерили оптическую плотность при длине волны 415 нм.

10) Гемолиз (%) рассчитали по следующему уравнению.

Гемолиз (%) = $(OD \text{ образца} - OD \text{ 0\% гемолиза}) / (OD \text{ 100\% гемолиза} - OD \text{ 0\% гемолиза}) \times 100$

Пример 6-3. Подтверждение соотношения катионного и нейтрального липидов в катионной липосоме на основании результатов анализа гемолиза

1) Соотношение липидов DDA(18:0):DOPC(18:1), которое ингибирует индуцированный сапонином гемолиз.

Гемолиз, индуцированный 2,5 мкг дигитонина, был ингибирован на 100%, когда количество DDA в DDA:DOPC составляло от 40% до 60%, и гемолиз, индуцированный

1,25 мкг α -хедерина, был ингибирован на 100%, когда количество DDA в DDA:DOPC составляло от 30% до 70% (фиг. 26).

Гемолиз, индуцированный 2,5 мкг неочищенного сапонины, был ингибирован на 100%, когда количество DDA в DDA:DOPC составляло от 30% до 70%, и гемолиз, индуцированный 2,5 мкг QS21, был ингибирован на 100%, когда количество DDA в DDA:DOPC составляло от 30% до 70% (фиг. 27).

2) Соотношение липидов DOTAP(18:1):DMPC(14:0), которое ингибирует индуцированный сапонином гемолиз

Гемолиз, индуцированный 2,5 мкг дигитонина, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DMPC составляло 40% или более и гемолиз, индуцированный 1,25 мкг α -хедерина, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DMPC составляло от 40% до 90% (фиг. 28).

Гемолиз, индуцированный 2,5 мкг неочищенного сапонины, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DMPC составляло 30% или более и гемолиз, индуцированный 2,5 мкг QS21, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DMPC составляло 30% или более (фиг. 29).

3) Соотношение липидов DOTAP(18:1):DOPC(18:1), которое ингибирует индуцированный сапонином гемолиз

Гемолиз, индуцированный 2,5 мкг дигитонина, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DOPC составляло 40% или более, и гемолиз, индуцированный 1,25 мкг α -хедерина, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DOPC составляло от 20% или более (фиг. 30).

Гемолиз, индуцированный 2,5 мкг неочищенного сапонины, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DOPC составляло 10% или более, и гемолиз, индуцированный 2,5 мкг QS21, был ингибирован на 100%, когда количество DOTAP в DOTAP:DOPC составляло от 10% или более (фиг. 31).

Пример 6-4. Результаты

Как описано в примере 6-3, на основании результатов измерения соотношений катионных липидов и нейтральных липидов в различных катионных липосомах для различных сапонинов, когда соотношение катионного липида в катионной липосоме было от 10 до 100%, индуцированный сапонином гемолиз был эффективно ингибирован (таблица 21).

Таблица 21

Соотношение катионного липида в катионной липосоме, которое ингибирует гемолиз, индуцированный различными сапонинами												
Сапонин	Липосома	Соотношение катионного липида в катионной липосоме (% массовое отношение)										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Дигитонин	DDA(18:0): DOPC(18:1)					○	○	○				
α -Хедерин					○	○	○	○				
Неочищенный сапонин					○	○	○	○	○			
QS21					○	○	○	○	○			
Дигитонин	DOTAP(18:1) :DMPC(14:0)					○	○	○	○	○	○	○
α -Хедерин						○	○	○	○	○	○	
Неочищенный сапонин					○	○	○	○	○	○	○	○
QS21					○	○	○	○	○	○	○	○
Дигитонин	DOTAP(18:1) :DOPC(18:1)					○	○	○	○	○	○	○
α -Хедерин				○	○	○	○	○	○	○	○	○
Неочищенный сапонин			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
QS21			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Сапонин	Липосома	Соотношение катионного липида в катионной липосоме (% молярное отношение)										
		0	14	28	39	50	60	69	78	86	93	100
Дигитонин	DDA(18:0): DOPC(18:1)					○	○	○				
α -Хедерин					○	○	○	○				
Неочищенный сапонин					○	○	○	○	○			
QS21					○	○	○	○	○			
Сапонин	Липосома	Соотношение катионного липида в катионной липосоме (% молярное отношение)										
		0	15	27	39	50	60	69	78	86	93	100
Дигитонин	DOTAP(18:1) :DMPC(14:0)					○	○	○	○	○	○	○
α -Хедерин						○	○	○	○	○	○	
Неочищенный сапонин					○	○	○	○	○	○	○	○
QS21					○	○	○	○	○	○	○	○
Дигитонин	DOTAP(18:1) :DOPC(18:1)					○	○	○	○	○	○	○
α -Хедерин				○	○	○	○	○	○	○	○	○
Неочищенный сапонин			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
QS21			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

○: Индуцированный сапонином гемолиз ингибируется.

Промышленная применимость

Сапонин демонстрирует широкий спектр фармакологической и биологической активности, такой как противовоспалительная активность и т.д., включая сильную и эффективную иммунологическую активность, и, таким образом, эффективно используется в медицине и фармацевтике, однако, его недостатком является вызываемый им гемолиз эритроцитов. Обычно сапонин используют совместно с холестерином и т.д. для ингибирования вызываемого сапонином гемолиза, но, в соответствии с настоящим изобретением, подтверждается, что вызываемый сапонином гемолиз эритроцитов можно ингибировать с использованием катионных липосом, которые более эффективны и

экономичны при ингибировании индуцируемого сапонином гемолиза. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением, сапонин можно с большей пользой применять при производстве усилителей иммунитета, носителей для доставки лекарств и т.д.

Хотя конкретные воплощения настоящего изобретения были подробно раскрыты, как описано выше, специалисту в данной области техники очевидно, что описание просто иллюстрирует предпочтительные примеры воплощения, и его не следует считать ограничивающим область настоящего изобретения. Таким образом, существенная область настоящего изобретения будет определена прилагаемой формулой изобретения или ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для ингибирования гемолиза эритроцитов сапонином, содержащая катионную липосому и сапонин, где катионная липосома содержит катионный липид и нейтральный липид.

2. Композиция по п. 1, где катионный липид или нейтральный липид содержит по меньшей мере одну ненасыщенную жирную кислоту.

3. Композиция по п. 1, где катионный липид выбран из группы, состоящей из: 1,2-диолеоил-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), диметилдиоктадециламмоний бромид (DDA), 3β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерин (DC-Chol), 1,2-диолеоил-3-(диметиламмоний)пропан (DODAP), 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмоний пропан (DOTMA), 1,2-димиристолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (14:1 Этил PC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (16:0-18:1 Этил PC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (18:1 Этил PC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (18:0 Этил PC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (16:0 Этил PC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (14:0 Этил PC), 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-этилфосфохолин (12:0 Этил PC), N1-[2-((1S)-1-[(3-аминопропил)амино]-4-[di(3-аминопропил)амино]бутилкарбоксамидо)этил]-3,4-ди[олеилокси]-бензамид (MVL5), 1,2-димиристоил-3-диметиламмоний-пропан (14:0 DAP), 1,2-дипальмитоил-3-диметиламмоний-пропан (16:0 DAP), 1,2-дистеароил-3-диметиламмоний-пропан (18:0 DAP), N-(4-карбоксобензил)-N,N-диметил-2,3-бис(олеилокси)пропан-1-аминий (DOBAQ), 1,2-стеароил-3-триметиламмоний-пропан (18:0 TAP), 1,2-дипальмитоил-3-триметиламмоний-пропан (16:0 TA), 1,2-димиристоил-3-триметиламмоний-пропан (14:0 TAP) и N4-холестерил-спермин (GL67).

4. Композиция по п. 1, где нейтральный липид выбран из группы, состоящей из следующих веществ: 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дилинолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилэтанолламин (PE), фосфатидилглицерол (PG), фосфорная кислота (PA), и фосфатидилхолин (PC).

5. Композиция по п. 1, где катионный липид представляет собой 1,2-диолеоил-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) или диметилдиоктадециламмоний бромид (DDA), а нейтральный липид выбран из группы, состоящей из следующих веществ: 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорилхолин (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE), 1,2-

дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC).

6. Композиция по п. 1, где массовая доля (%) катионного липида в катионной липосоме составляет от 10 до 100%.

7. Композиция по п. 1, где сапонин представляет собой неочищенный сапонин, полученный из *Quillaja saponaria*, QS21, содержащую QS21 фракцию, стероидный сапонин или тритерпеноидный сапонин.

8. Композиция для усиления иммунитета, содержащая композицию по любому из пп. 1 – 7.

9. Композиция по п. 8, дополнительно содержащая адъювант.

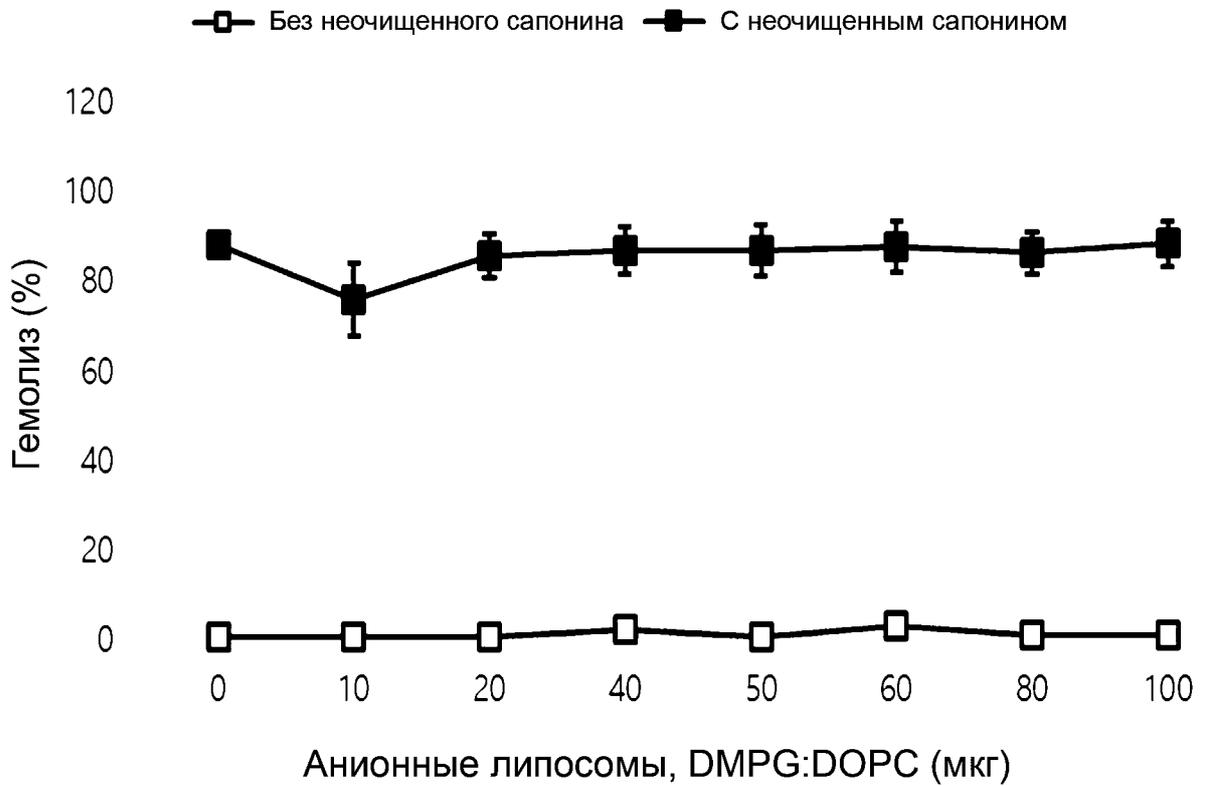
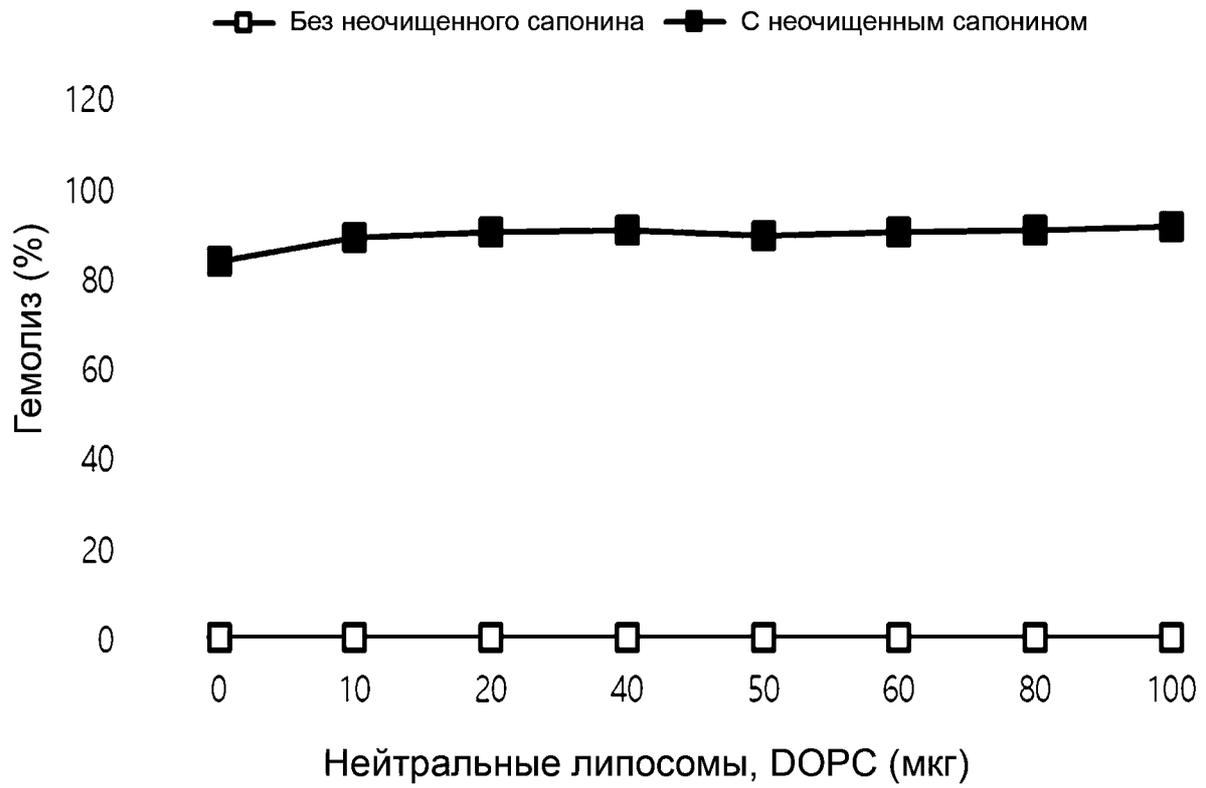
10. Композиция для доставки лекарства, содержащая композицию по любому из пп. 1 – 7.

11. Носитель для доставки лекарства, содержащий катионную липосому, где катионная липосома содержит катионный липид и нейтральный липид.

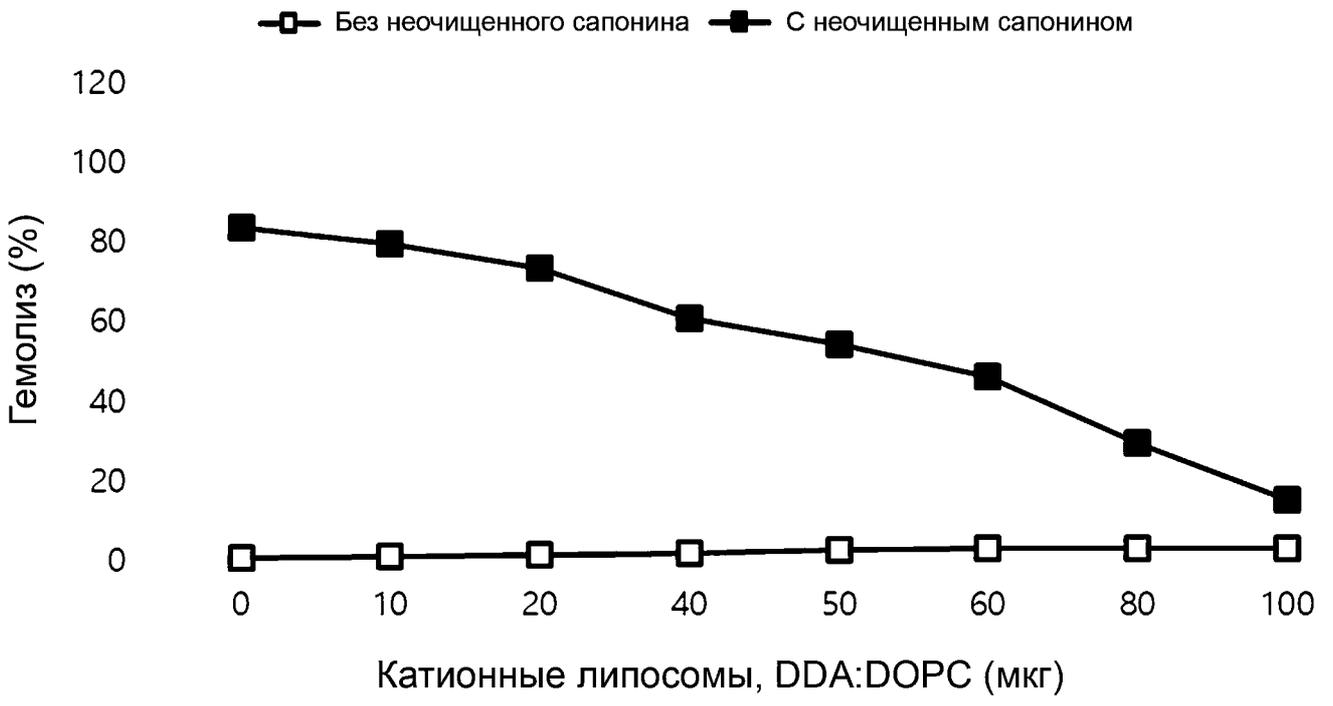
12. Носитель для доставки лекарства по п. 11, где катионный липид или нейтральный липид содержат по меньшей мере одну ненасыщенную жирную кислоту.

13. Комплекс лекарство-носитель, в котором лекарство адсорбировано на или инкапсулировано в катионной липосоме, где катионная липосома содержит катионный липид и нейтральный липид.

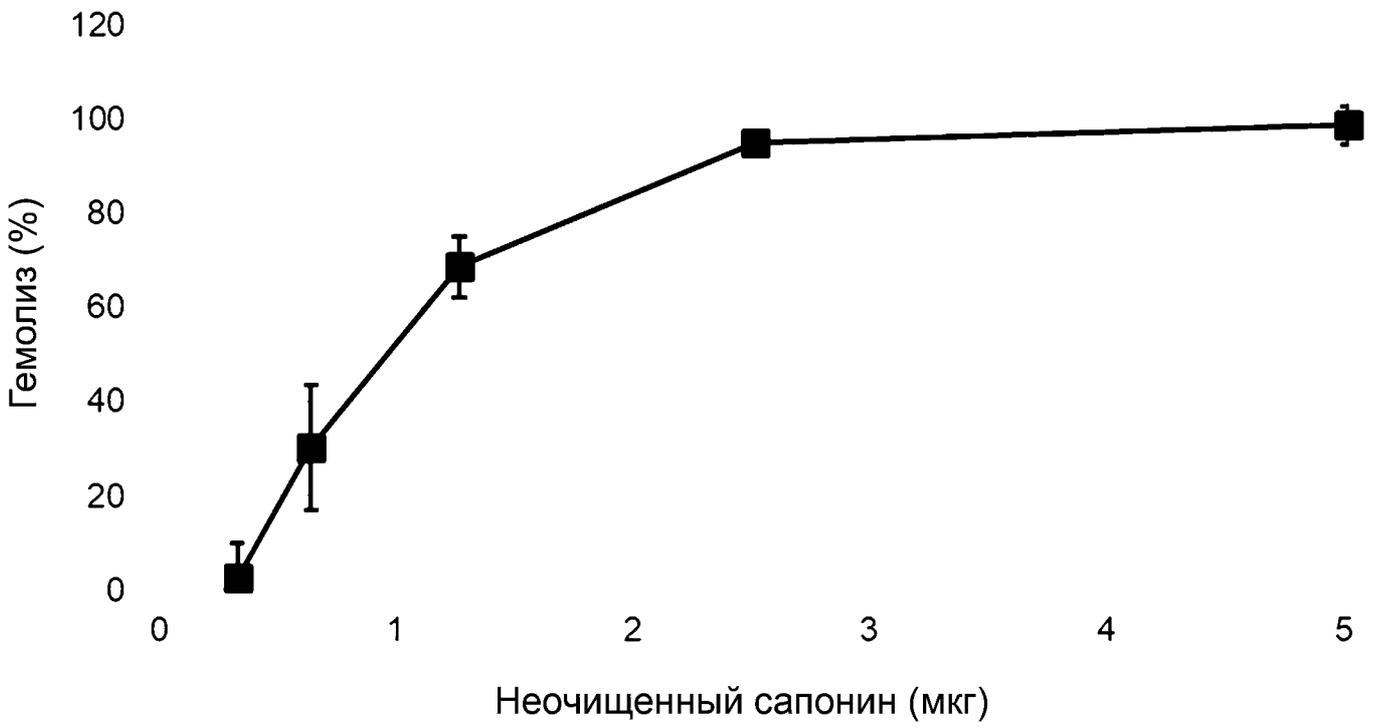
14. Комплекс лекарство-носитель по п. 13, где катионный липид или нейтральный липид содержат по меньшей мере одну ненасыщенную жирную кислоту.



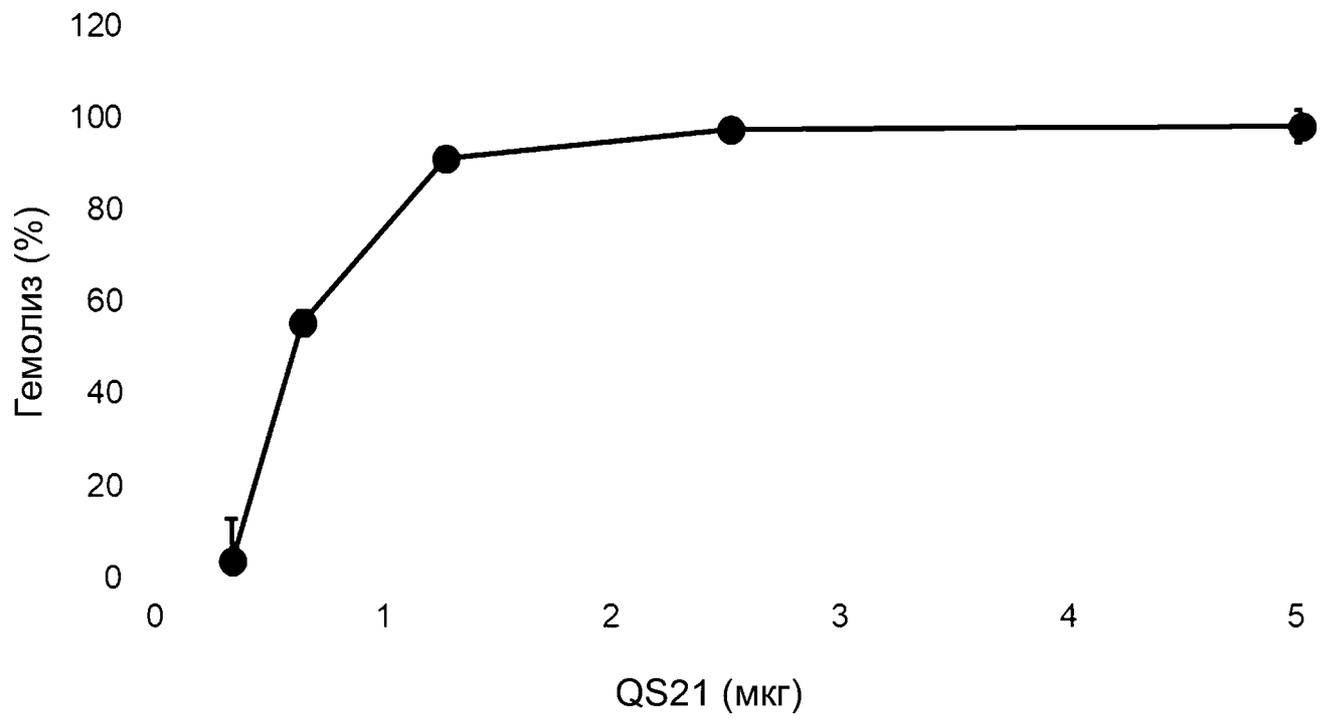
Фиг. 1



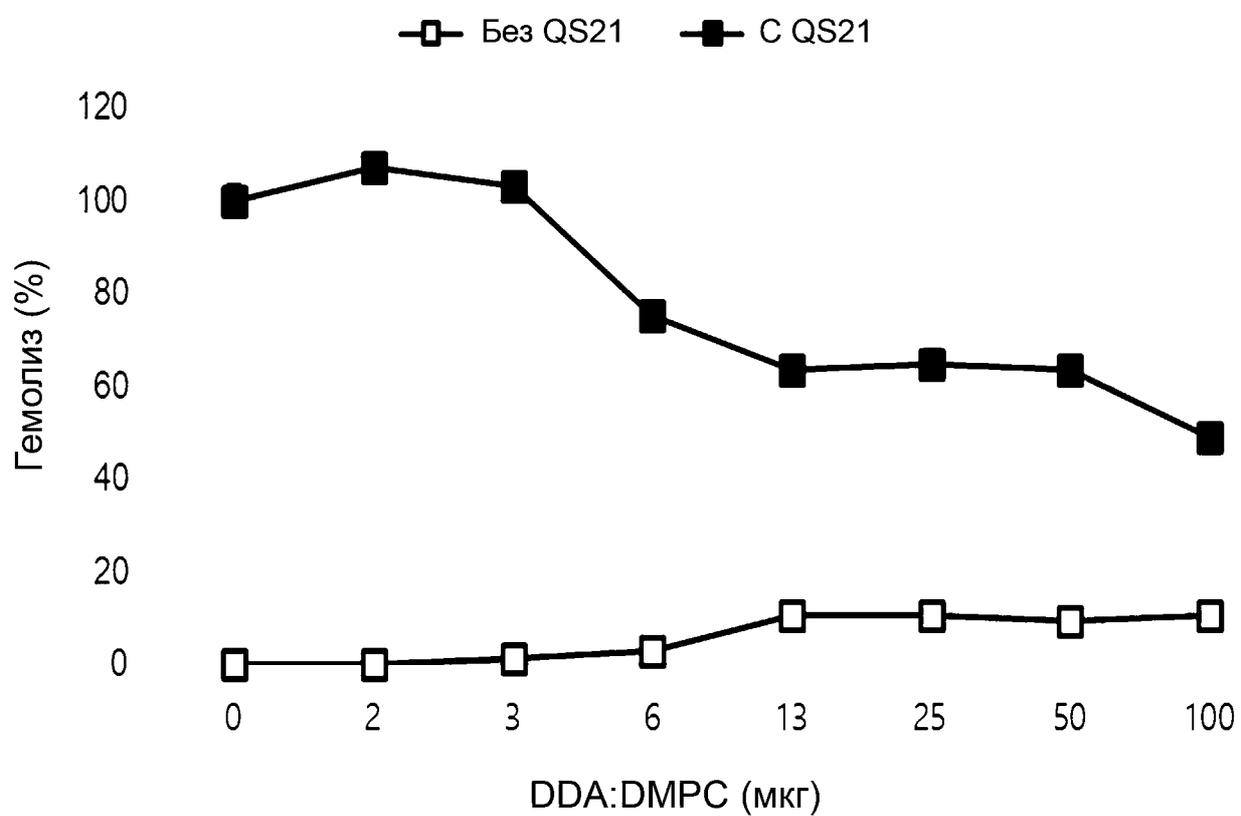
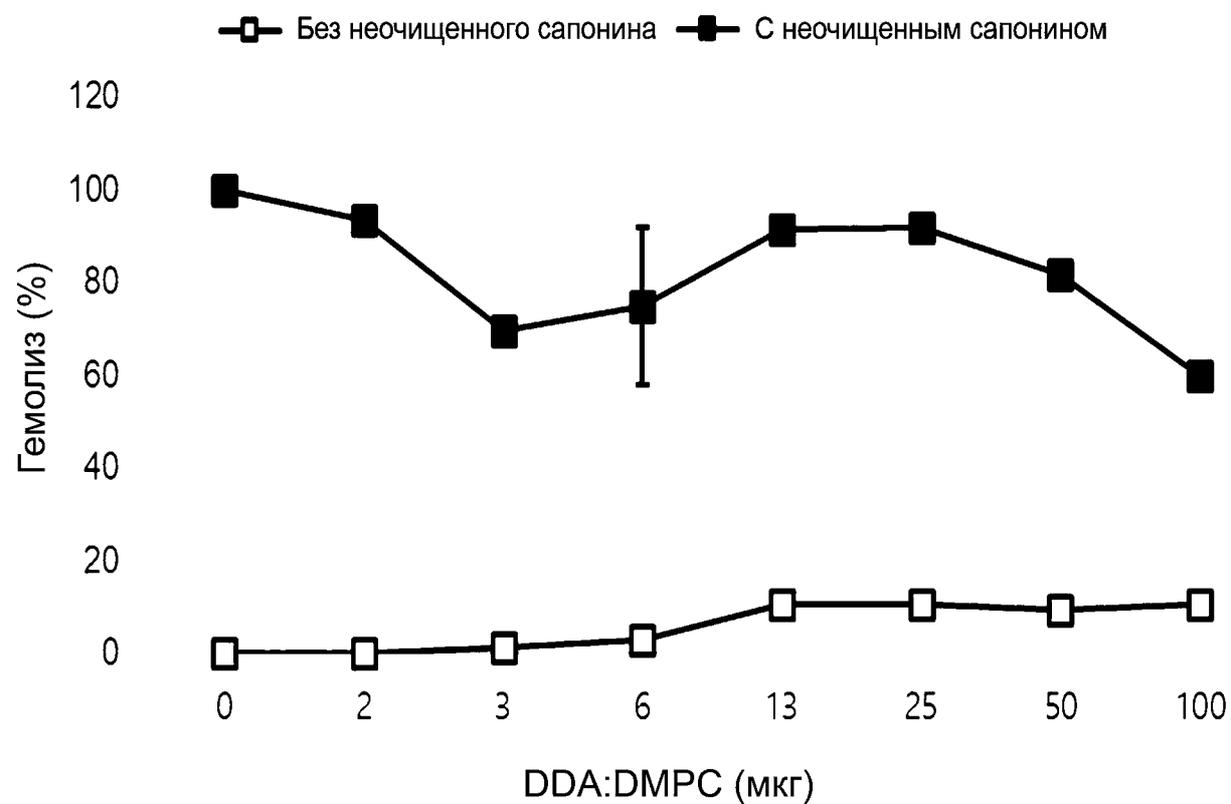
Фиг. 3



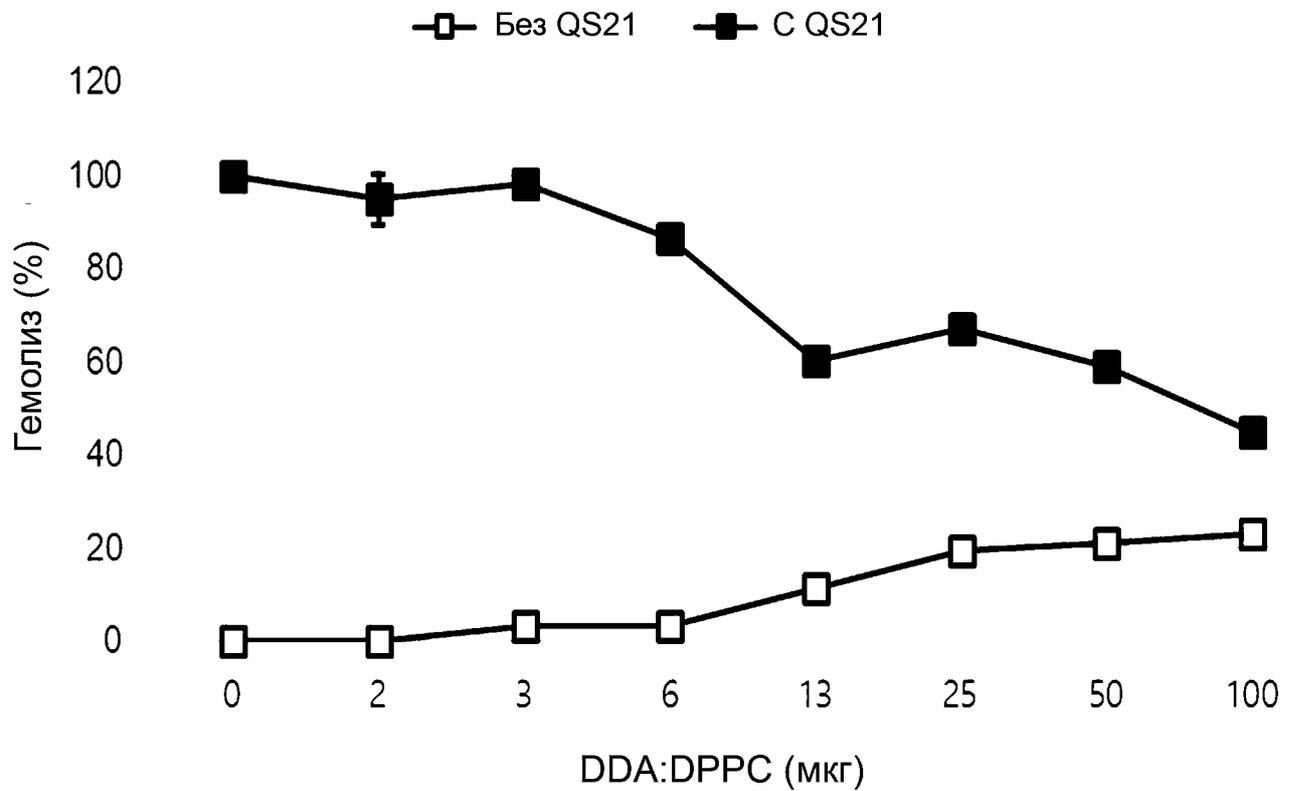
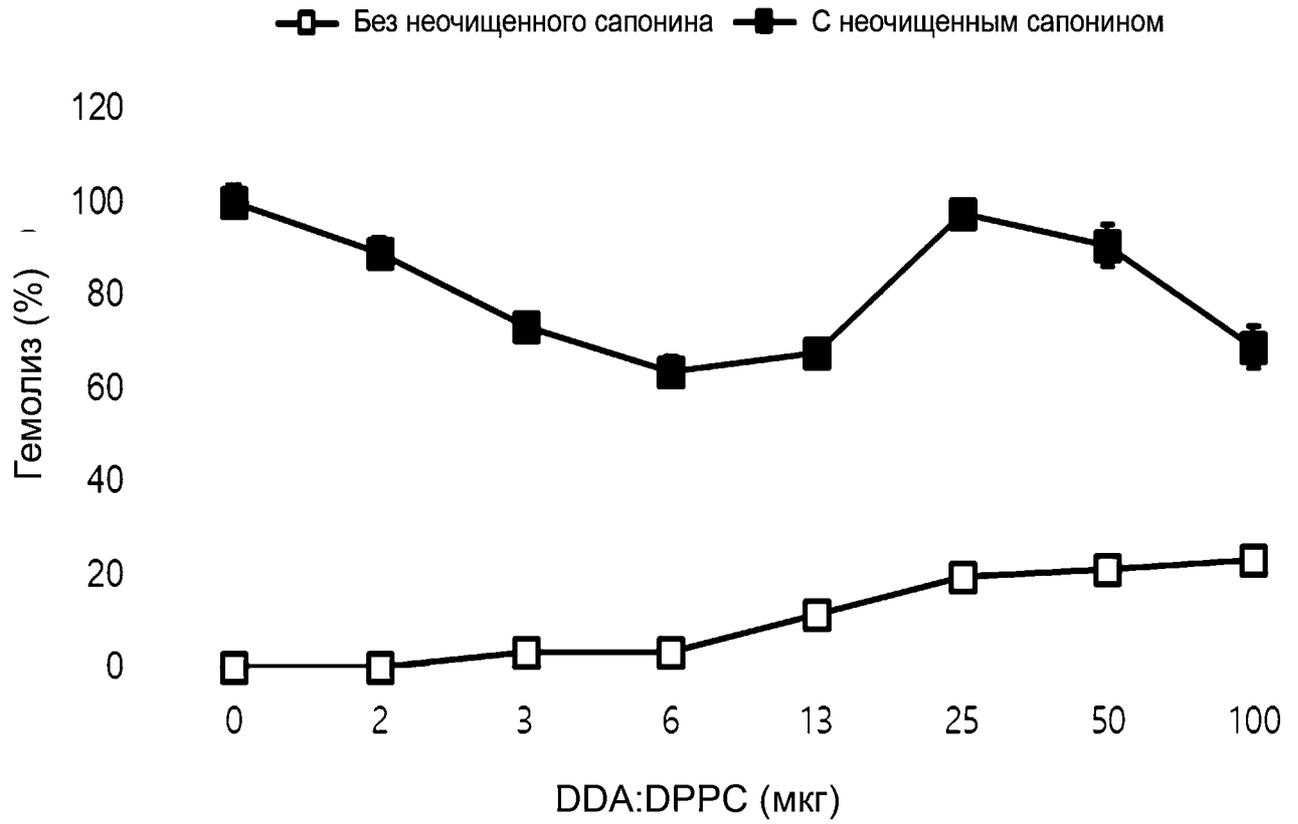
Фиг. 4



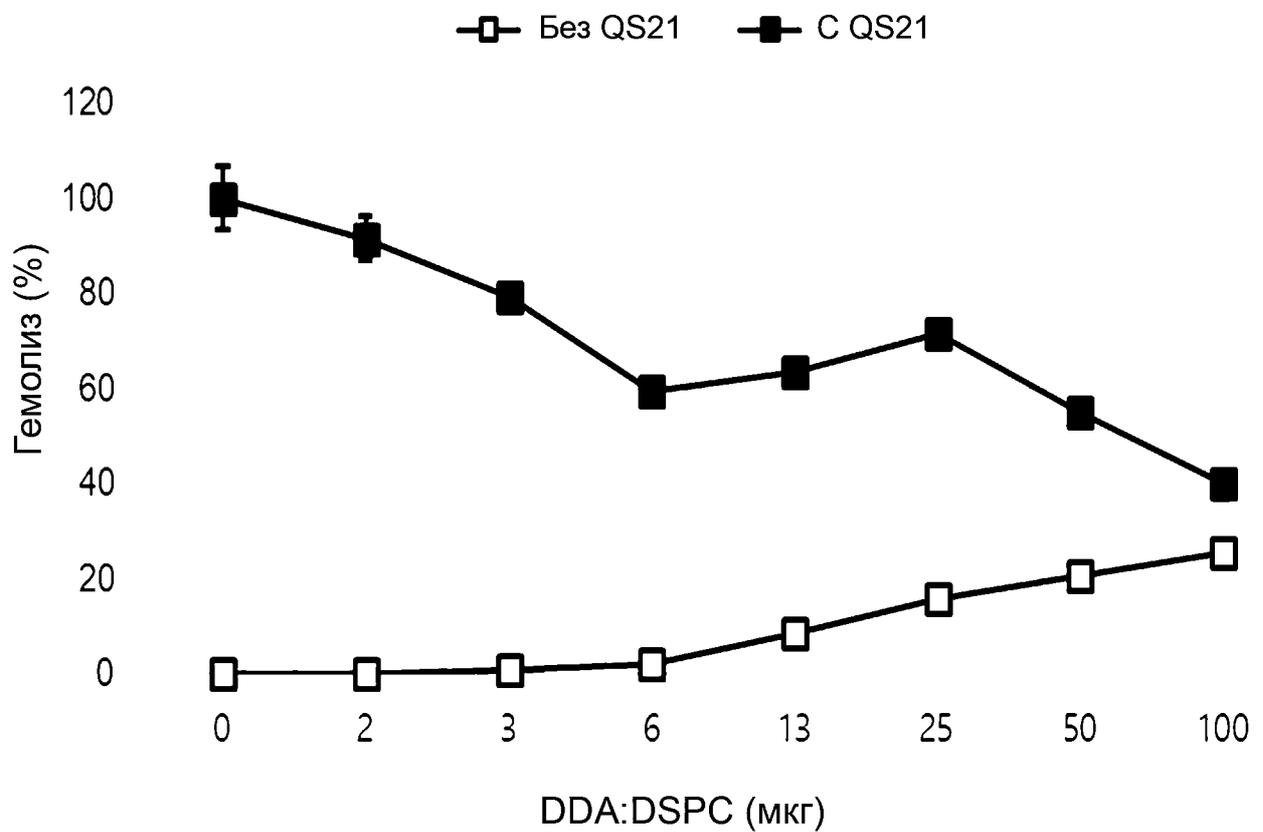
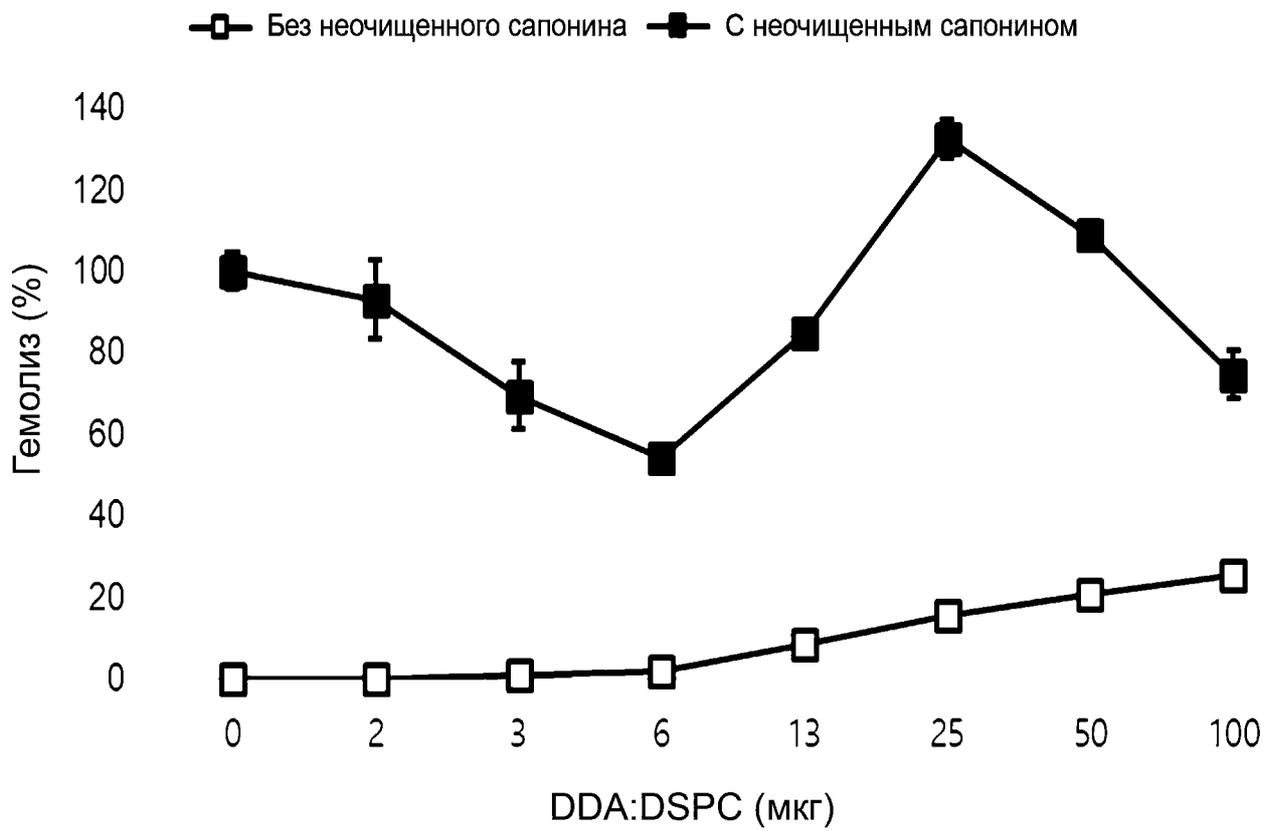
Фиг. 4



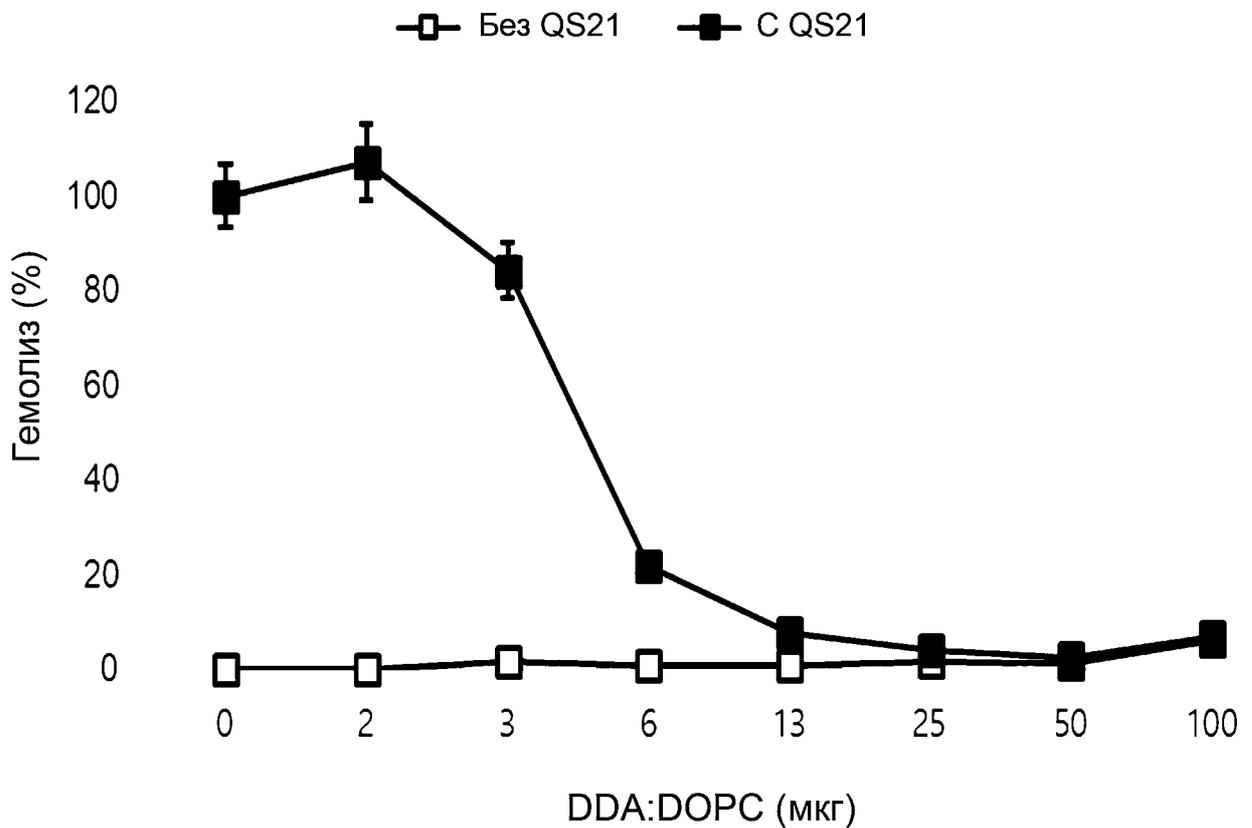
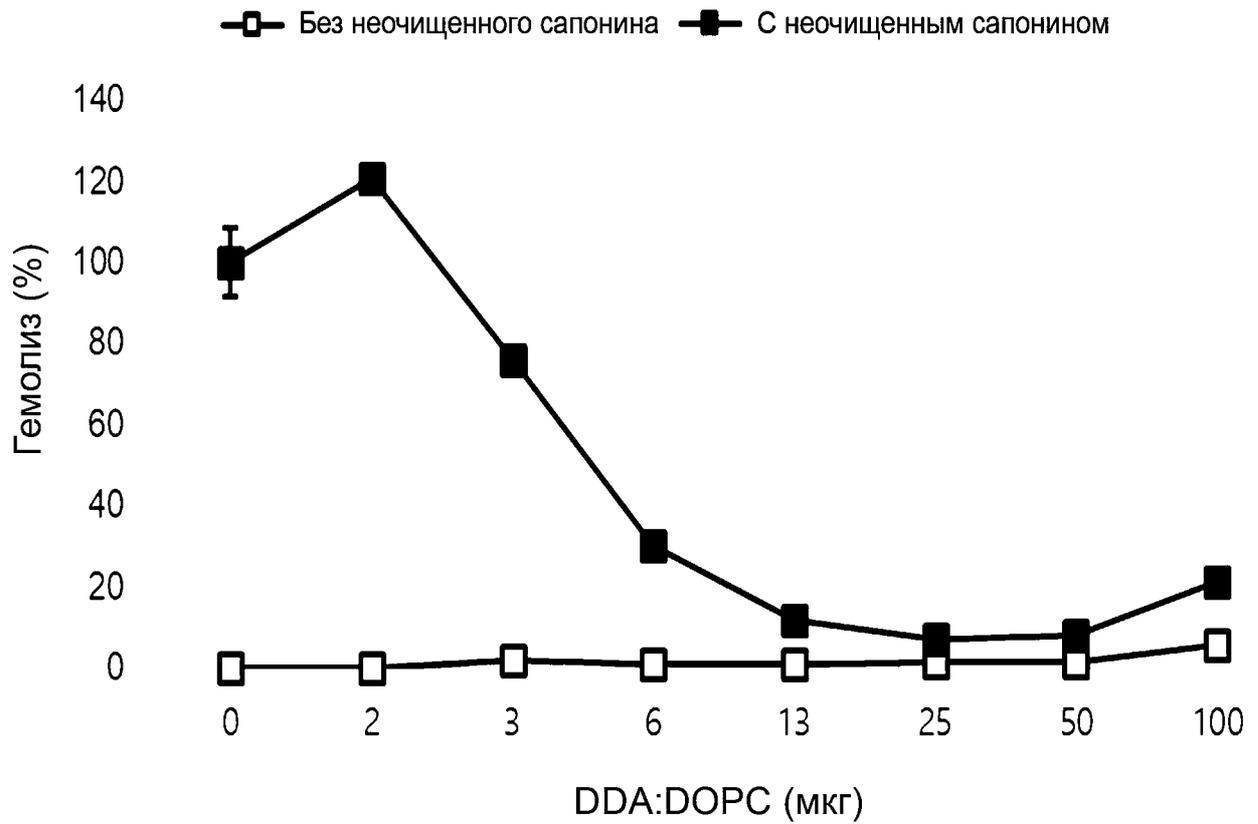
Фиг. 5



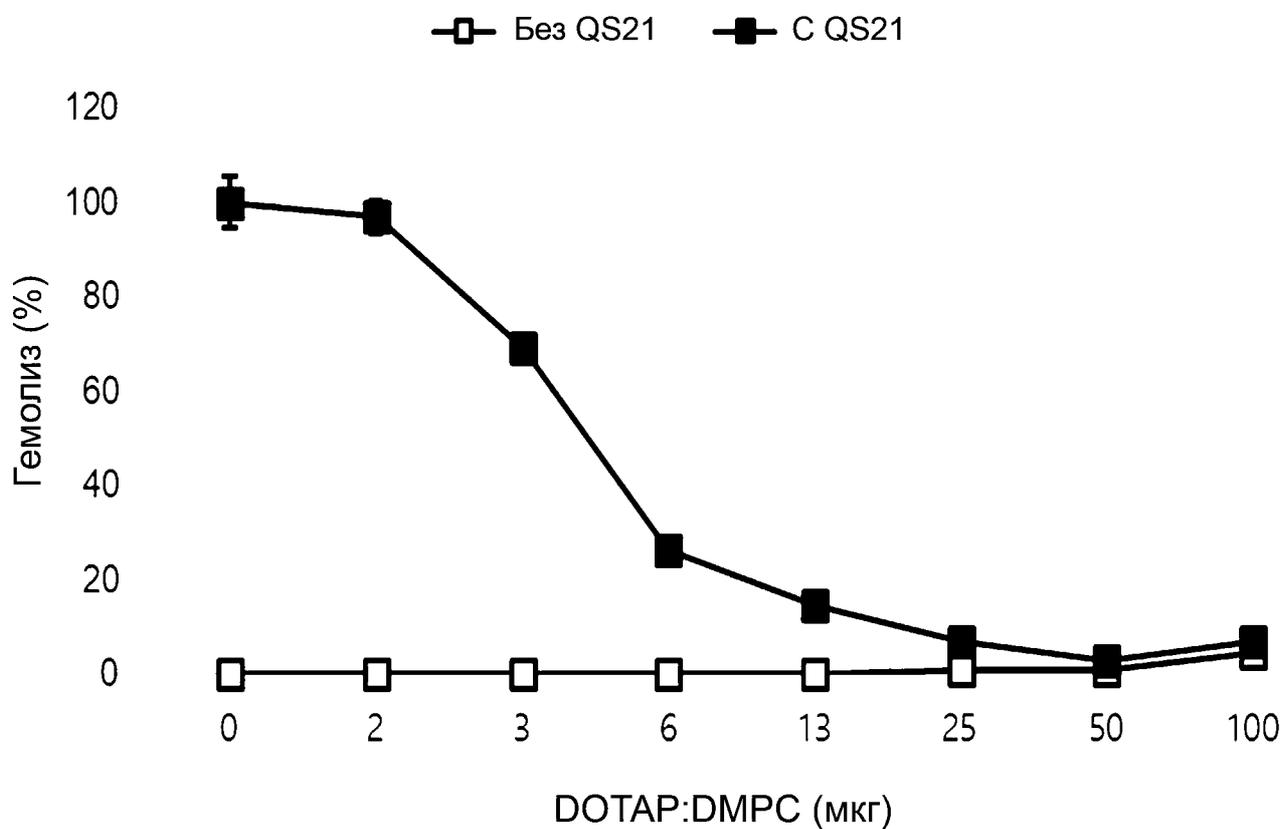
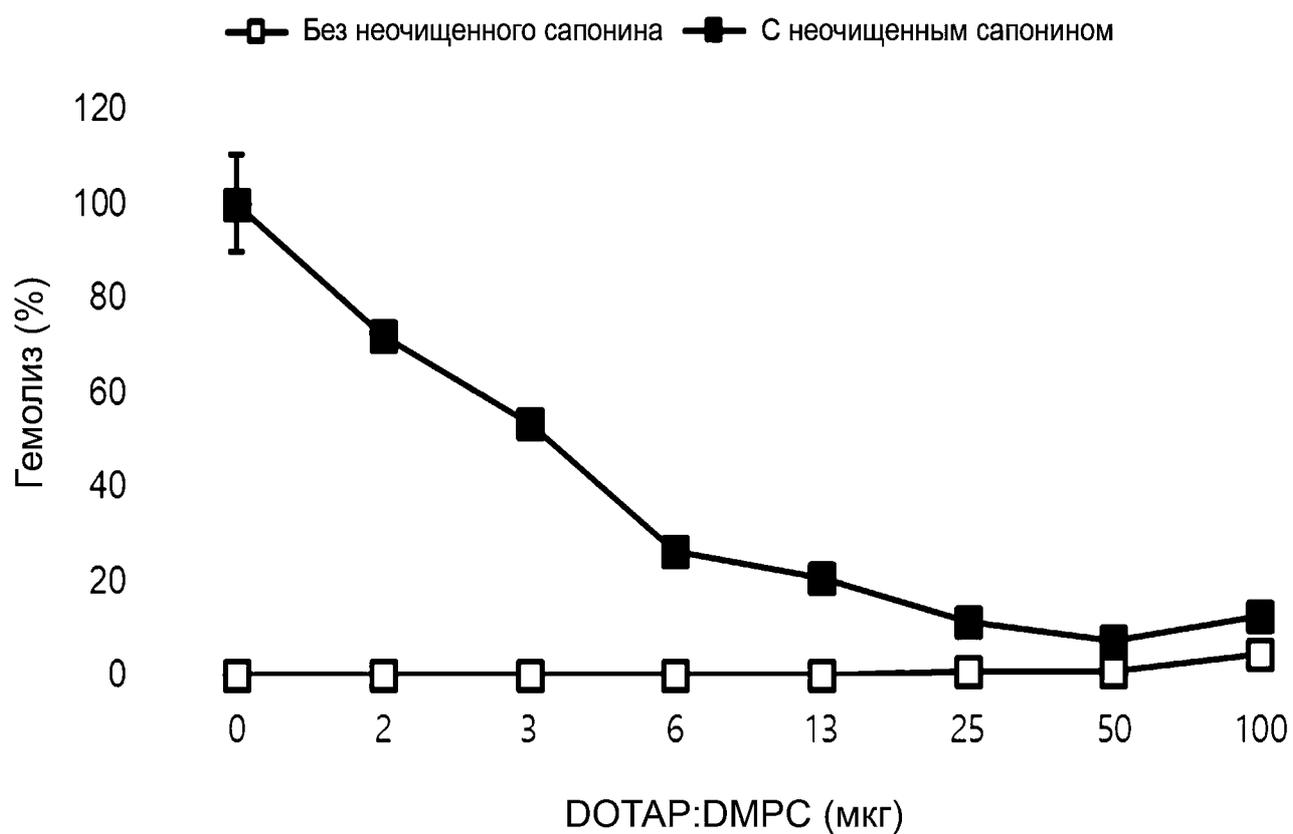
Фиг. 6



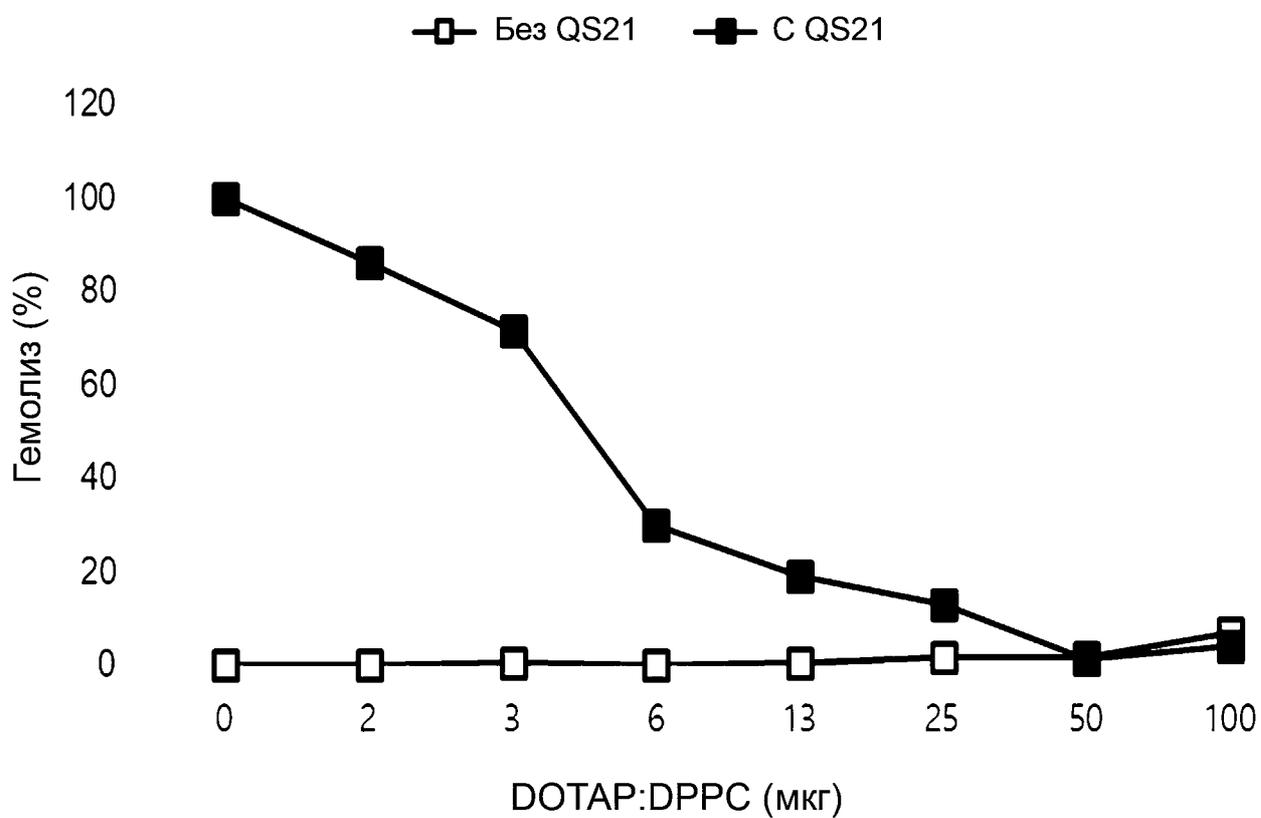
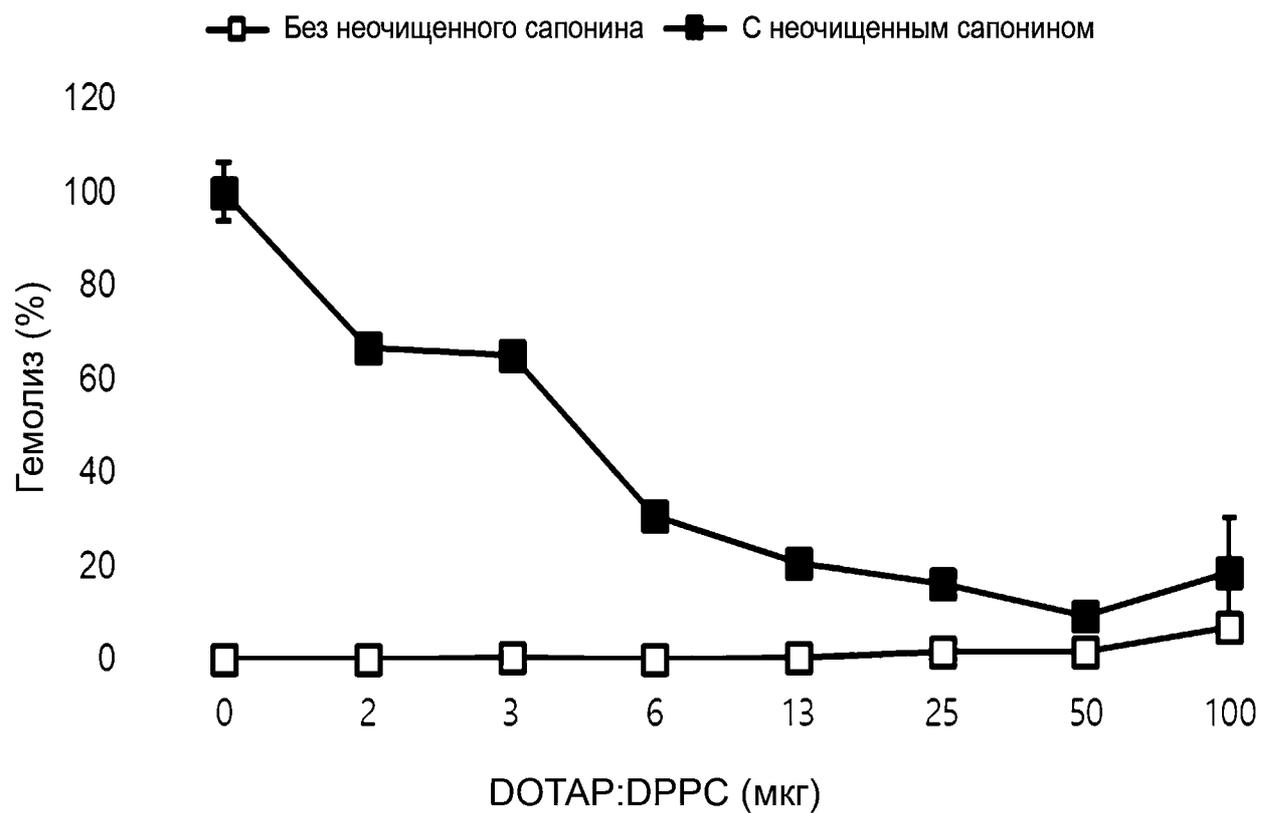
Фиг. 7



Фиг. 8

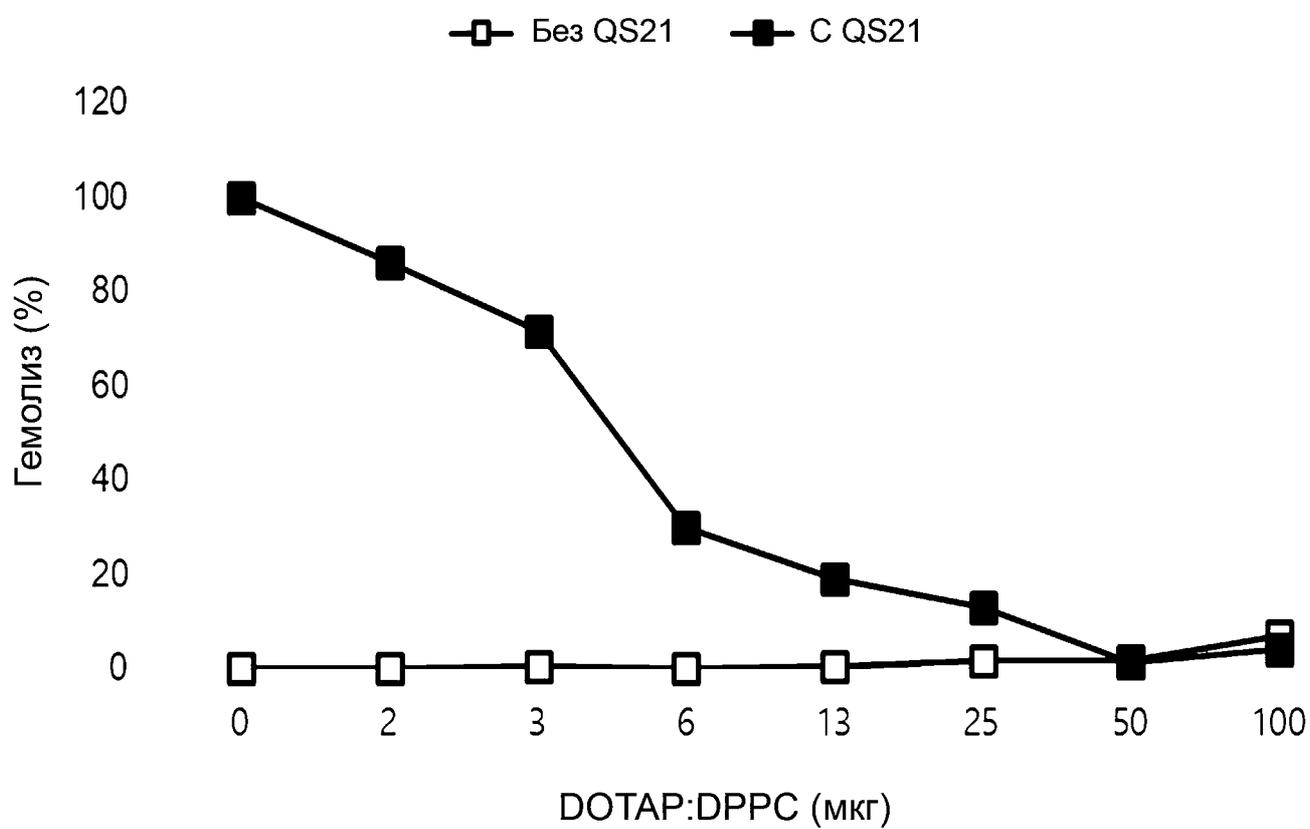
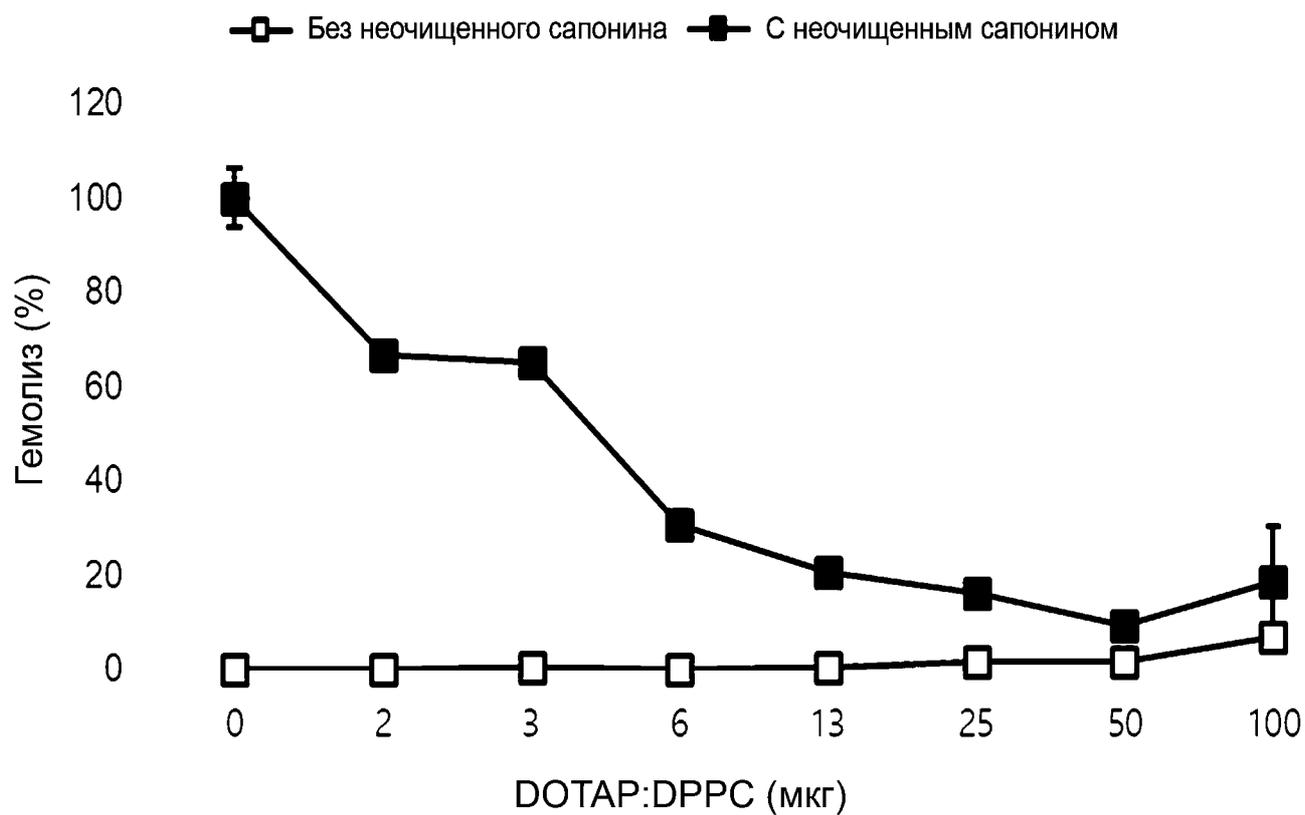


Фиг. 9



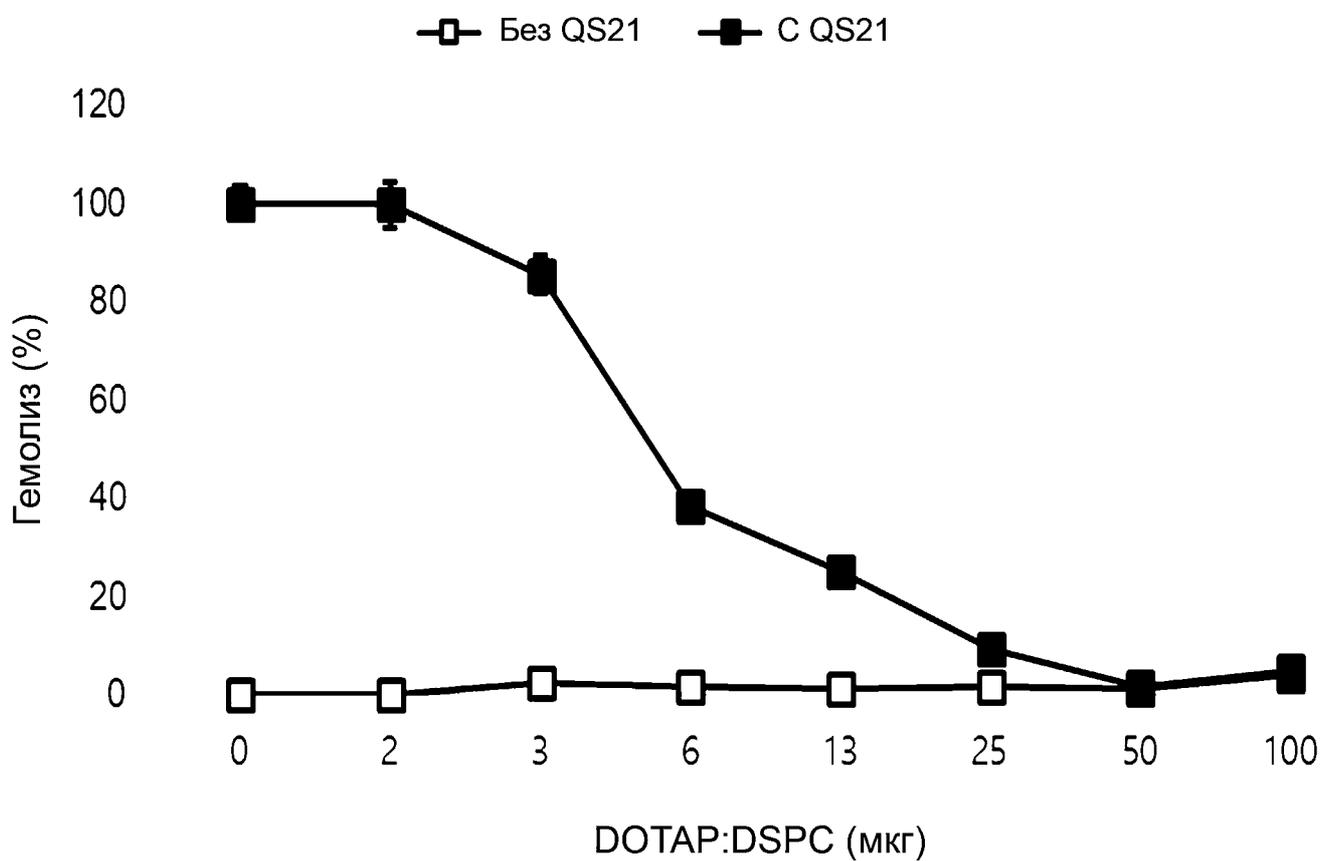
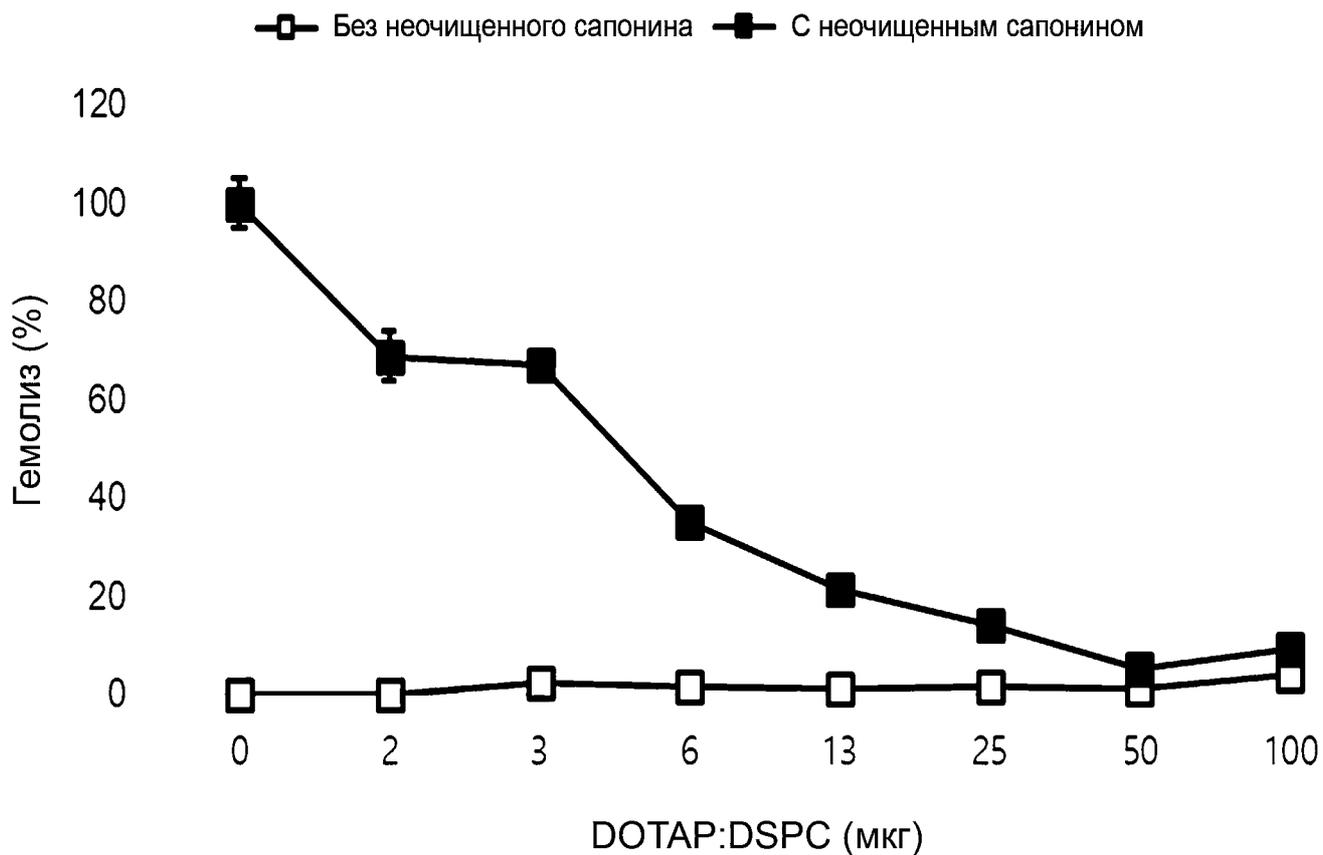
Фиг. 10

10/26



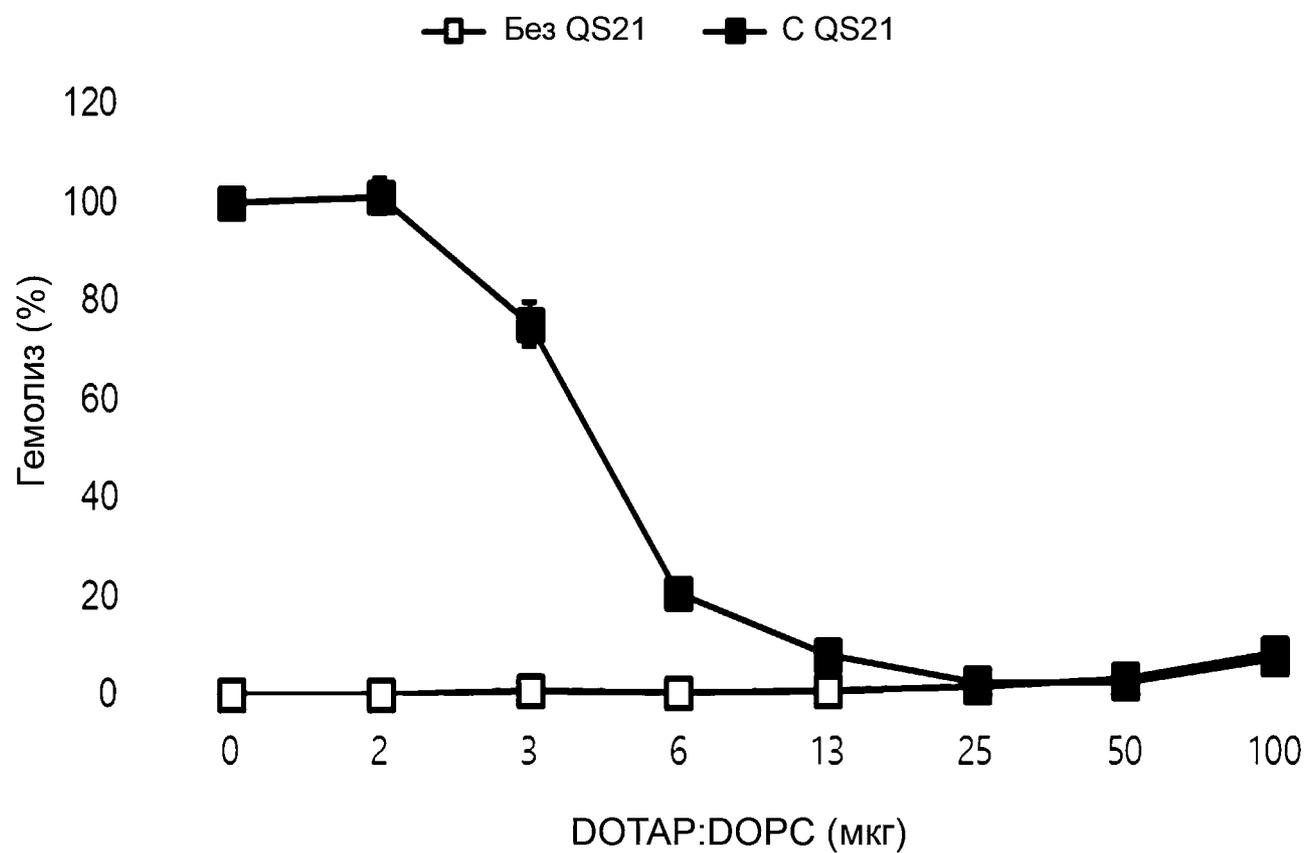
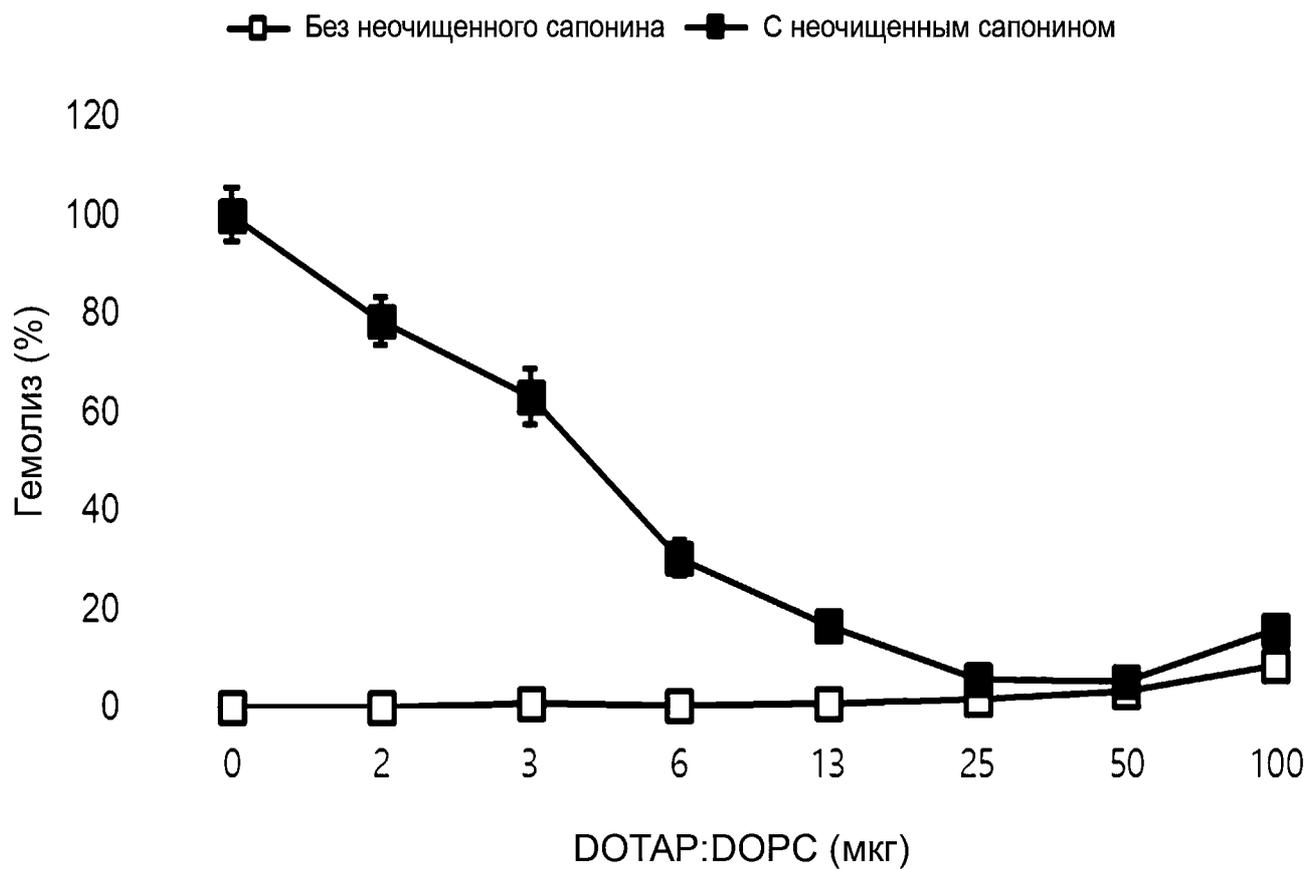
Фиг. 11

11/26

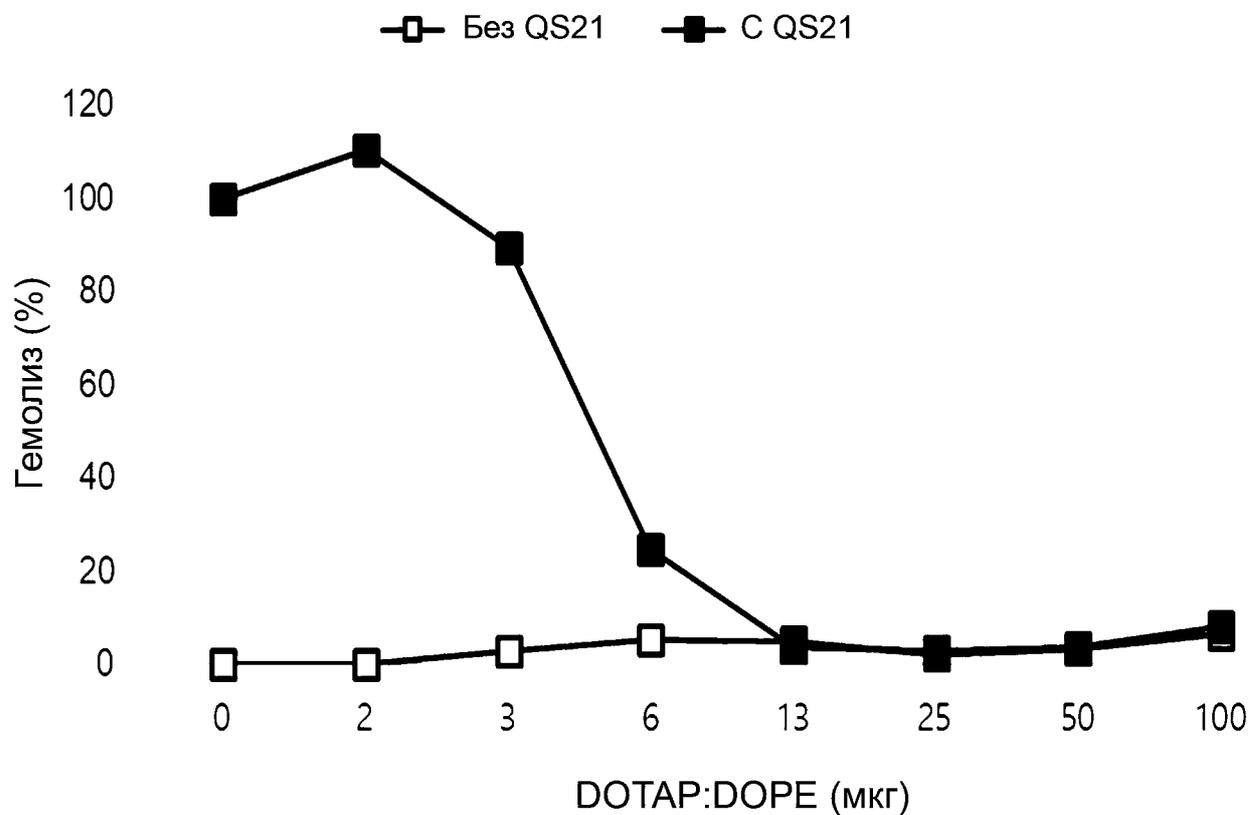
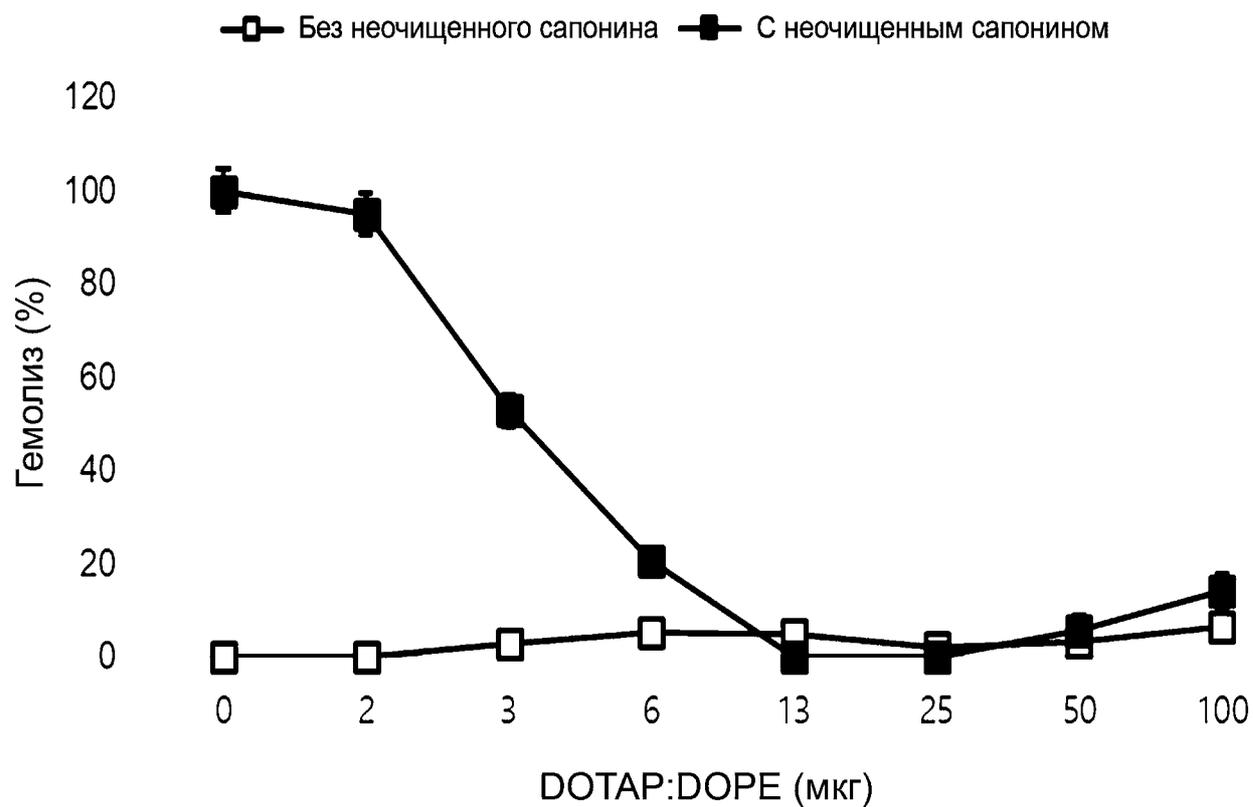


Фиг. 12

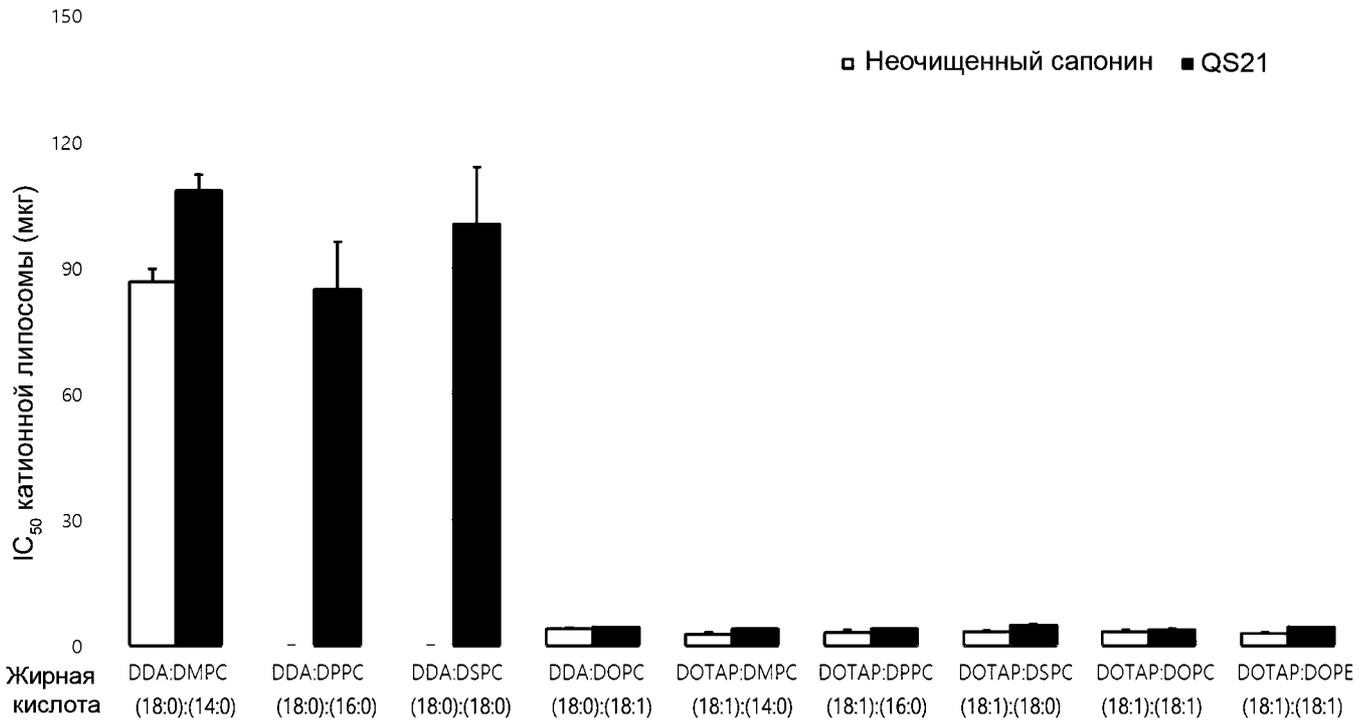
12/26



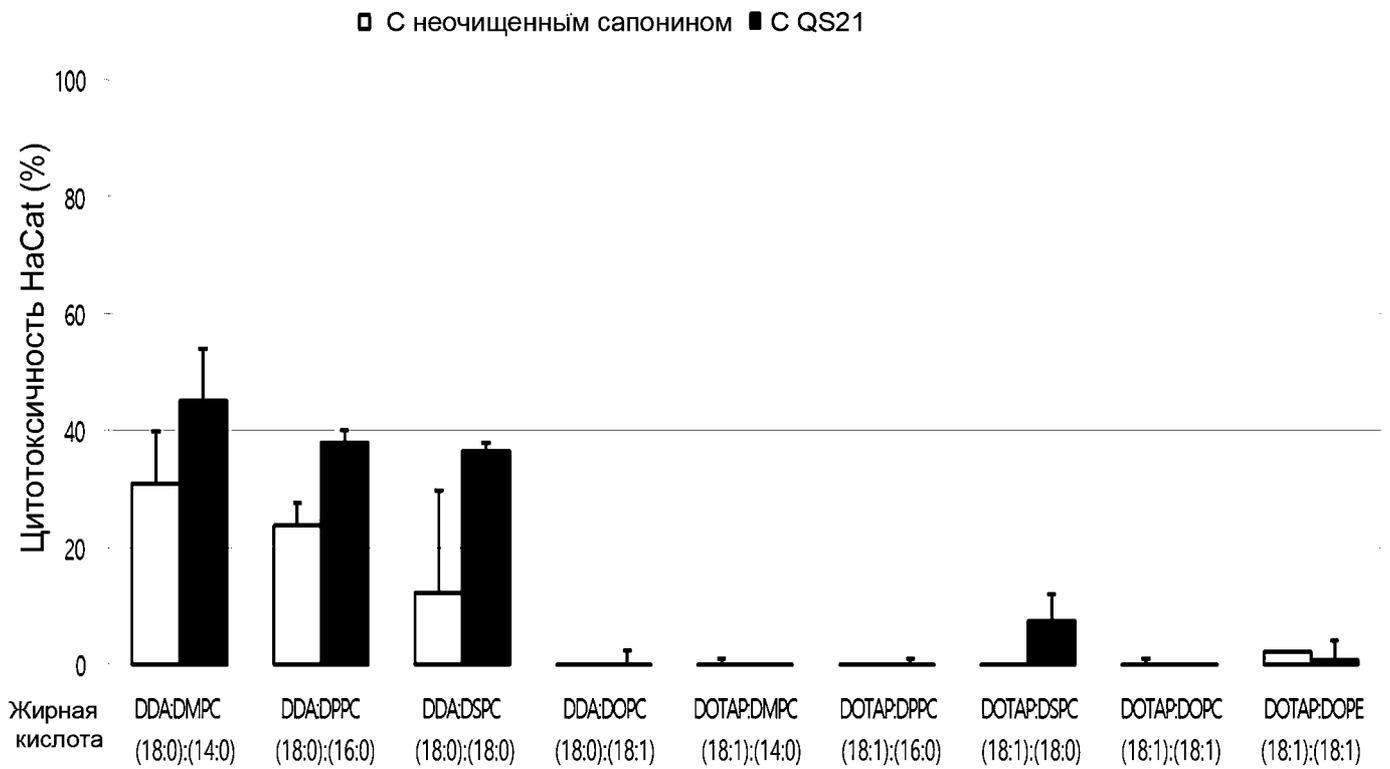
Фиг. 13А



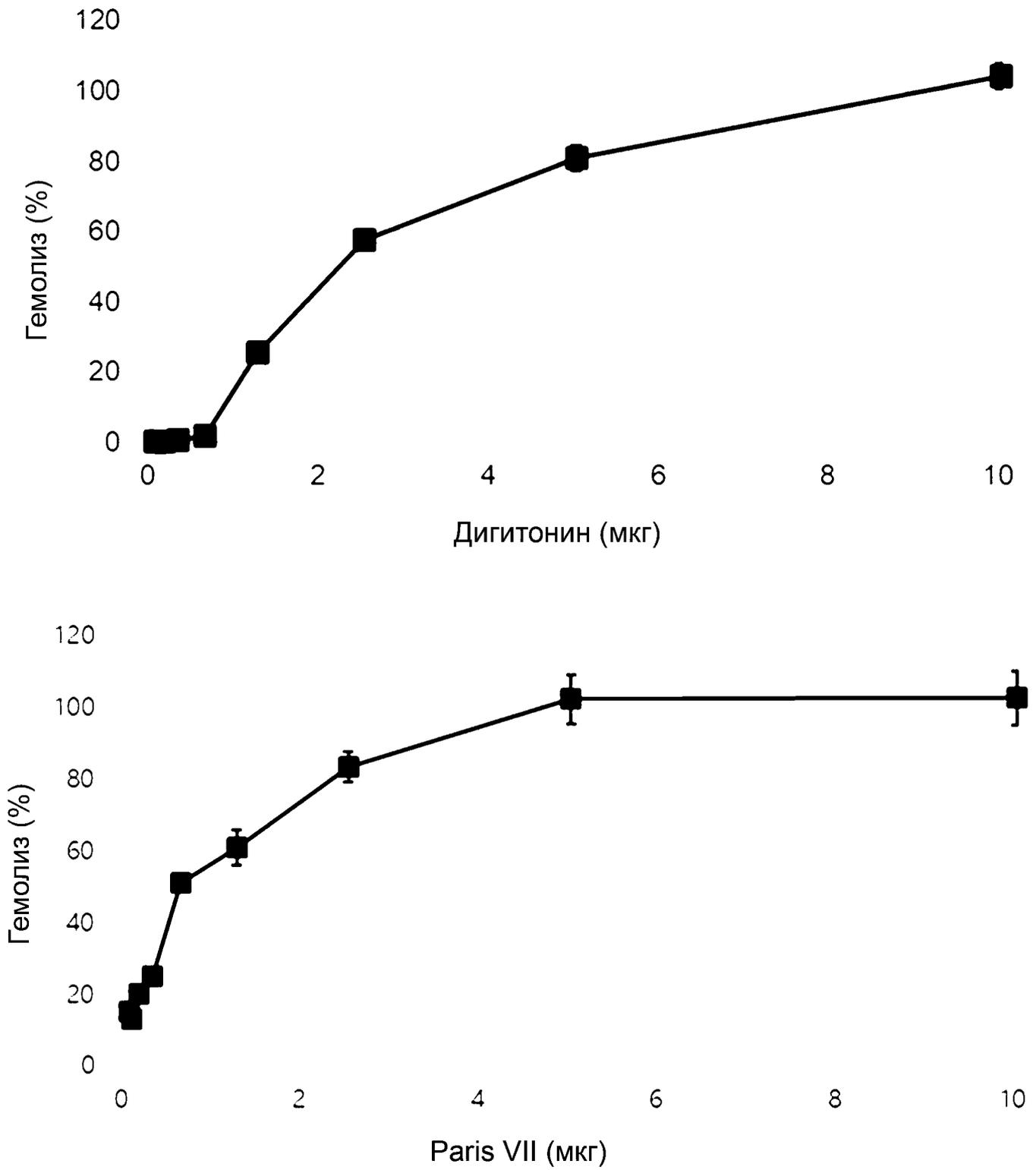
Фиг. 13В



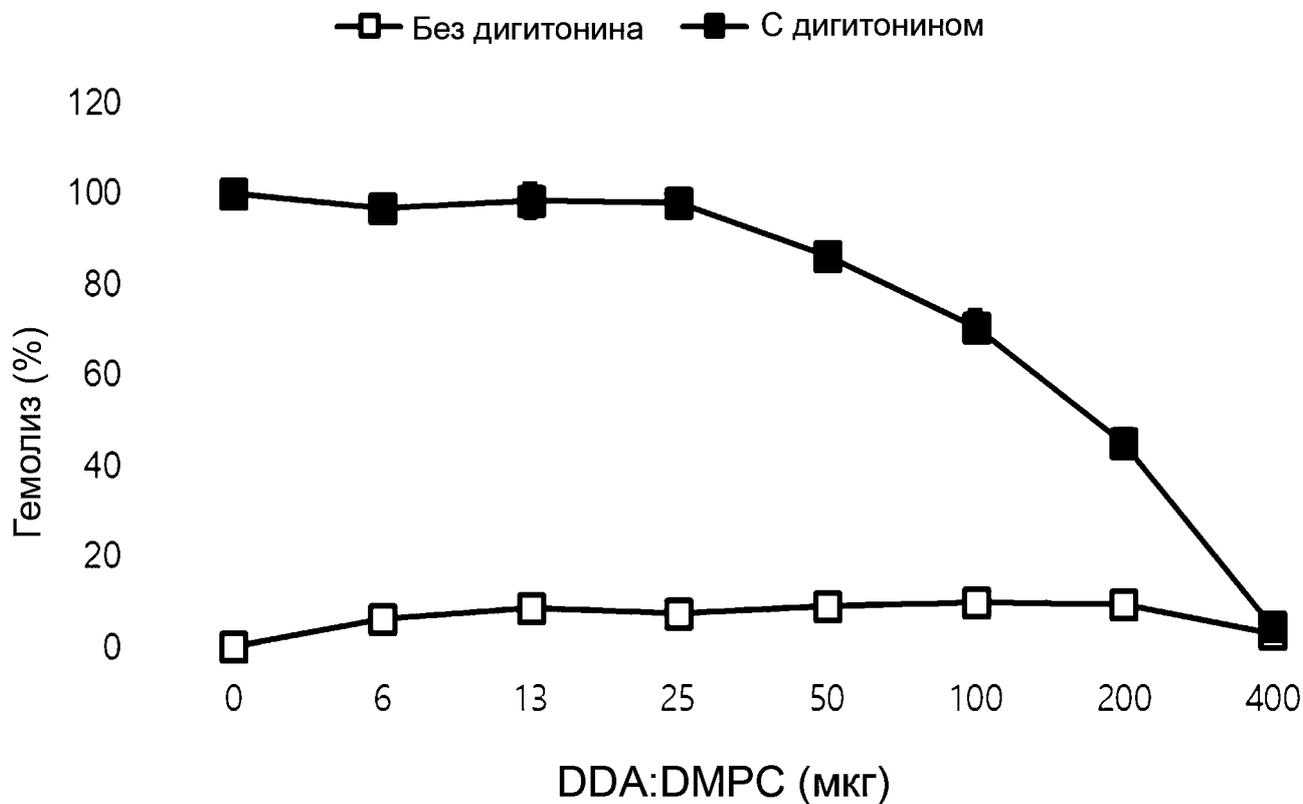
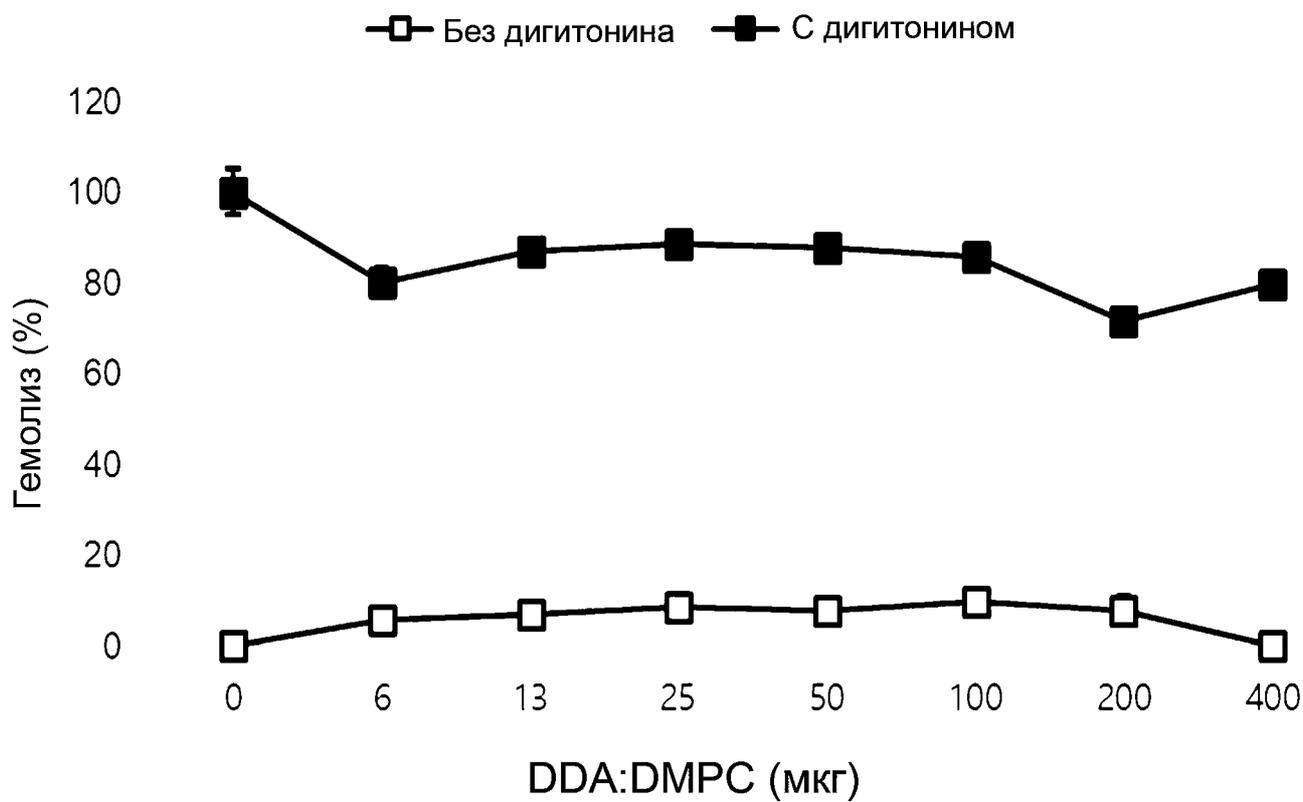
Фиг. 14



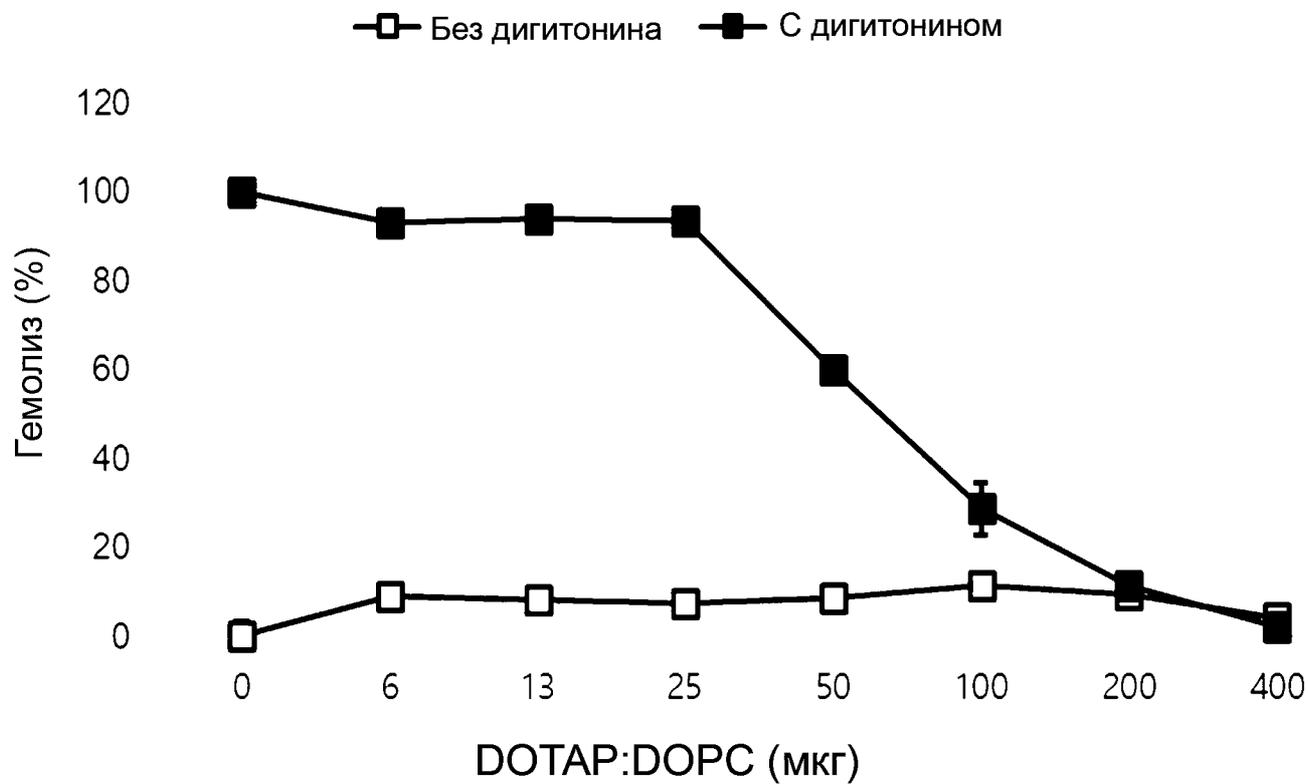
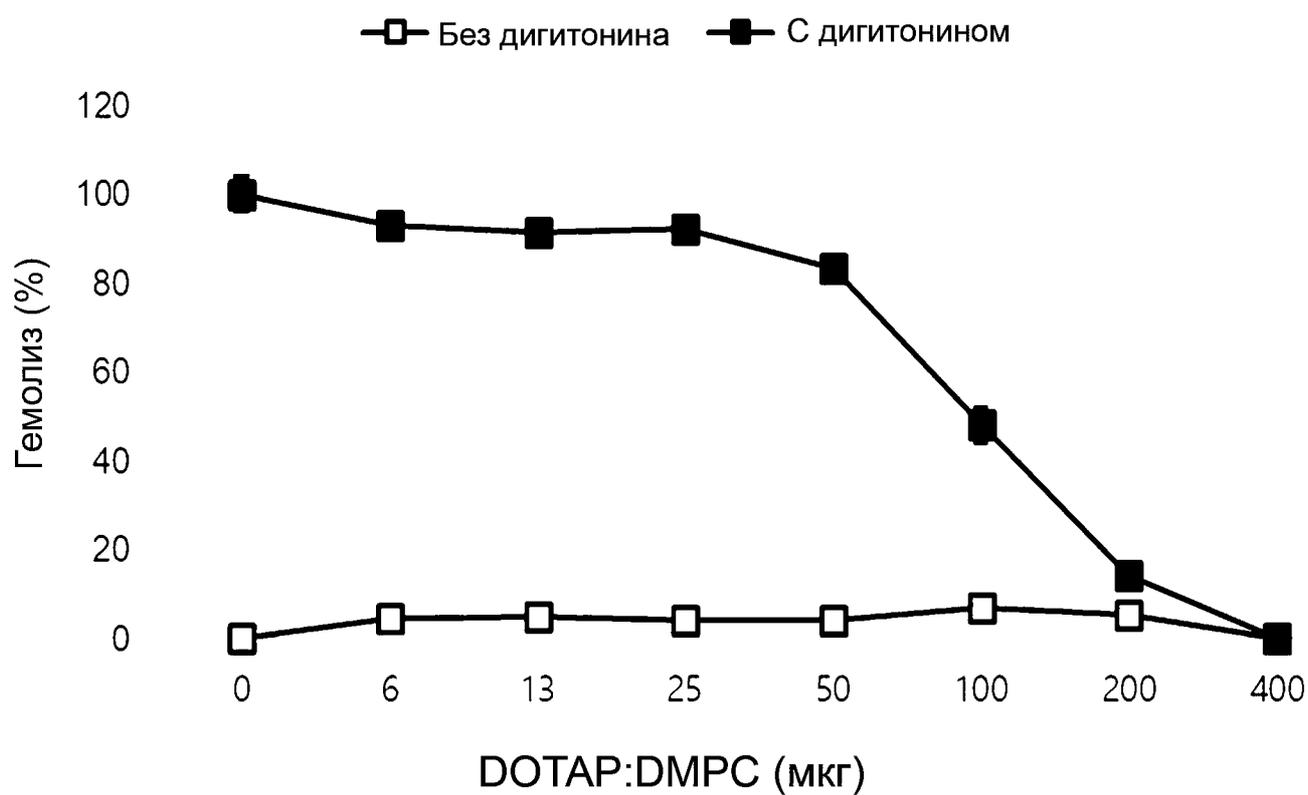
Фиг. 15



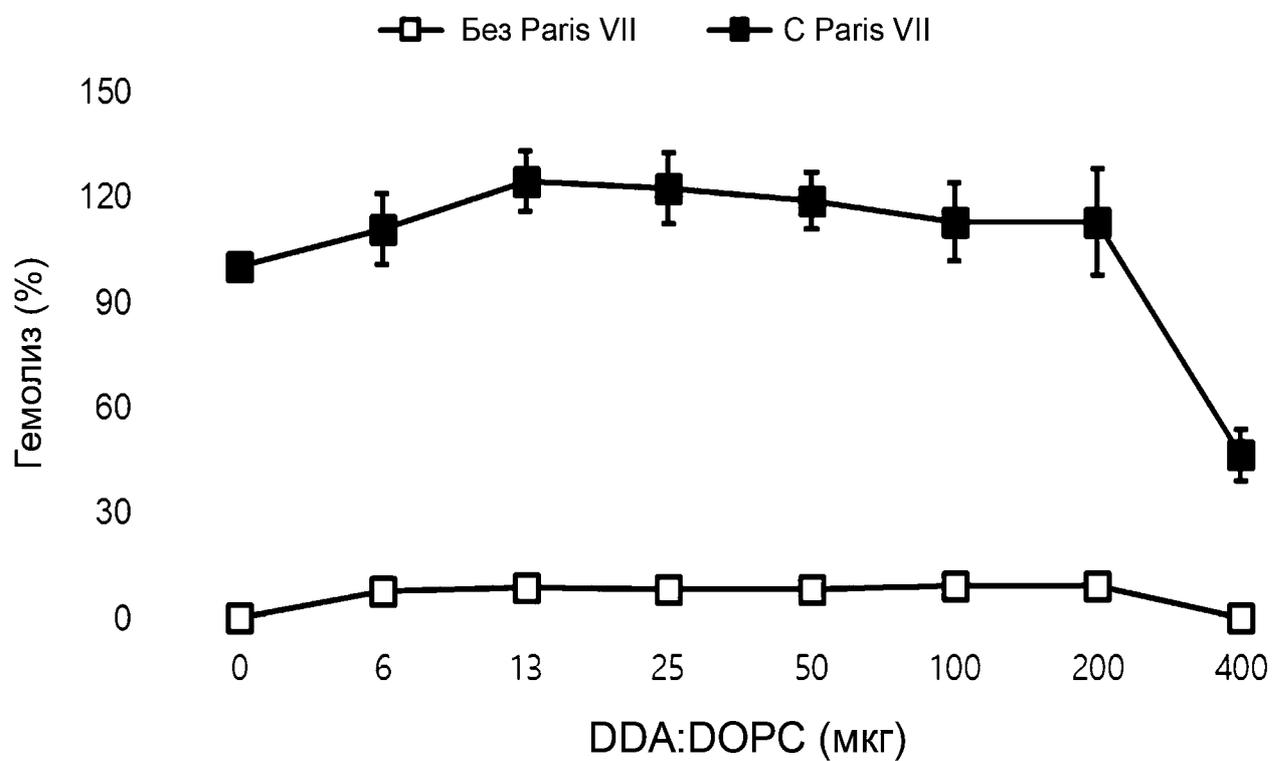
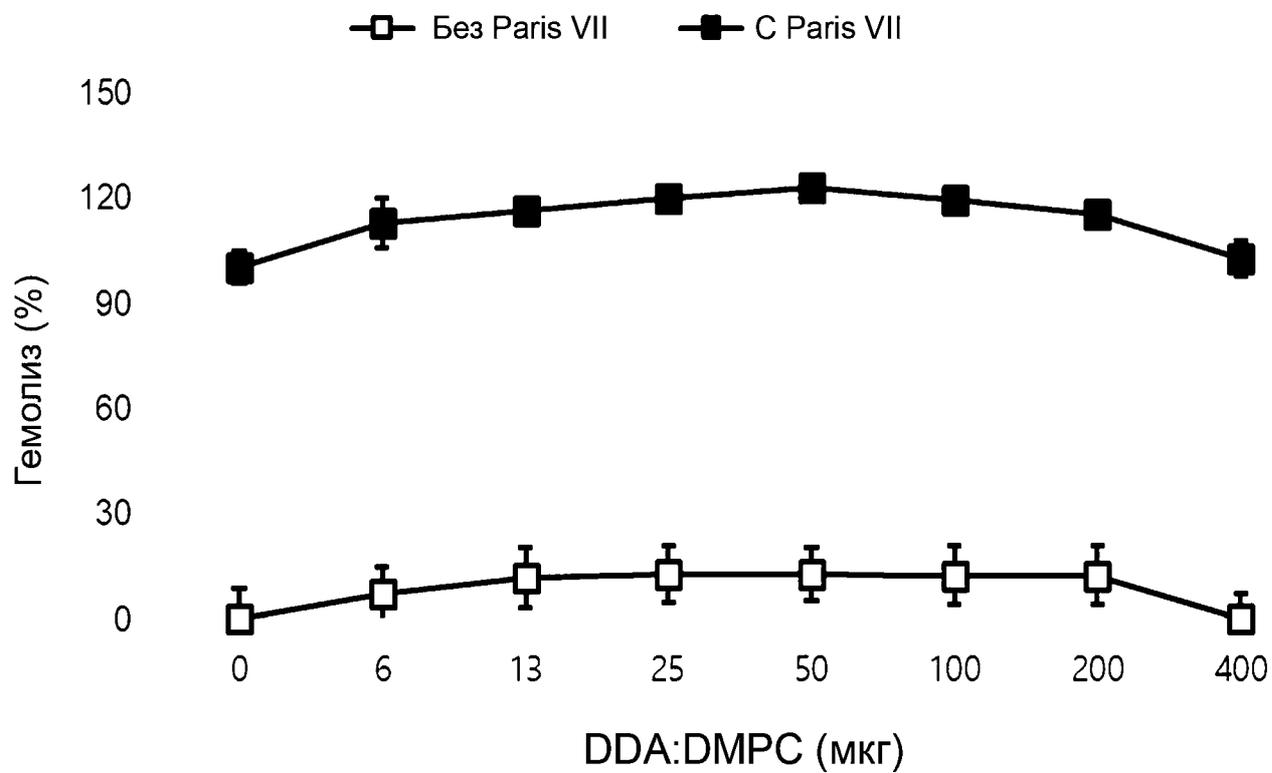
Фиг. 16



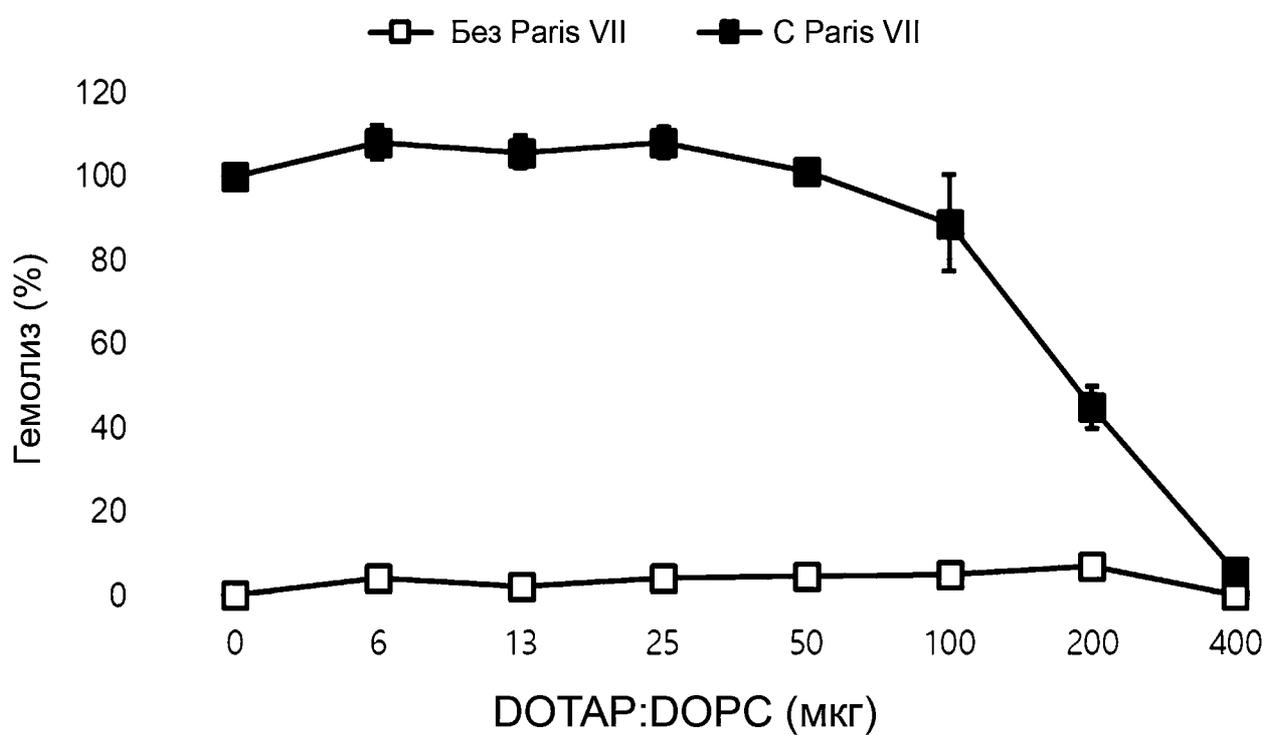
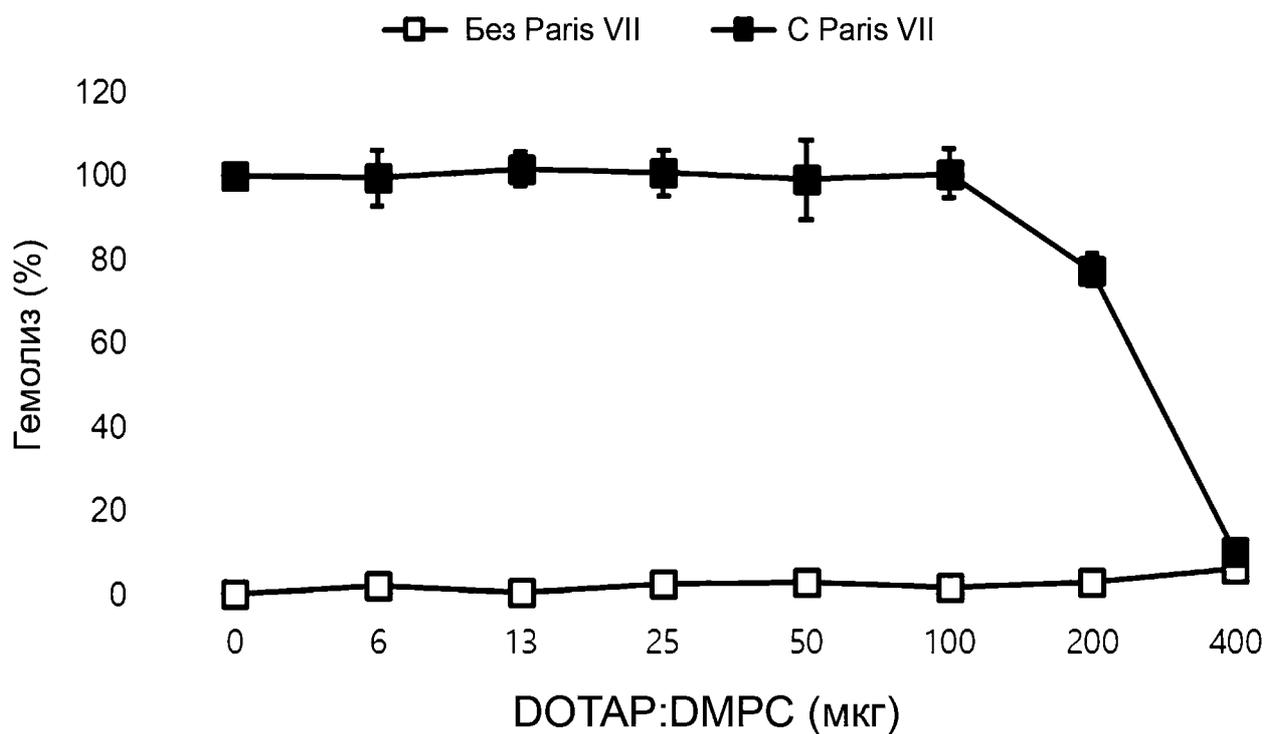
Фиг. 17



Фиг. 18

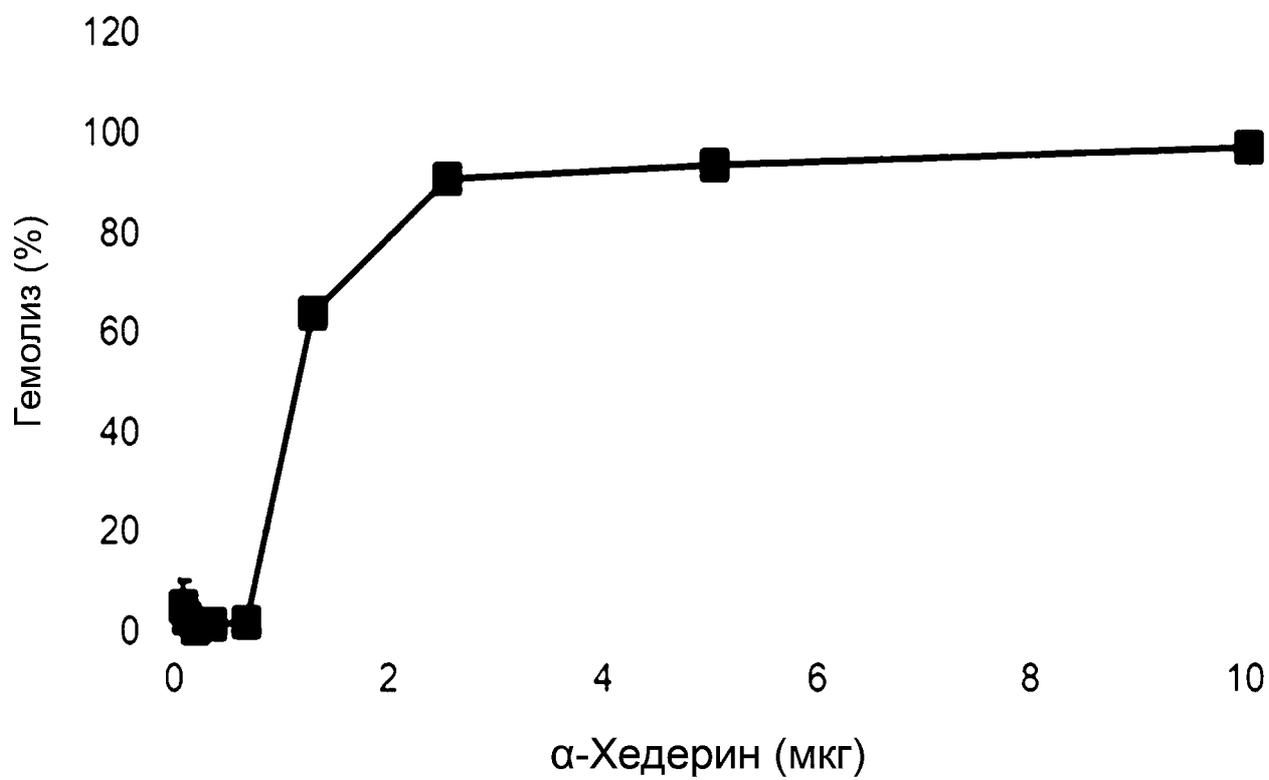
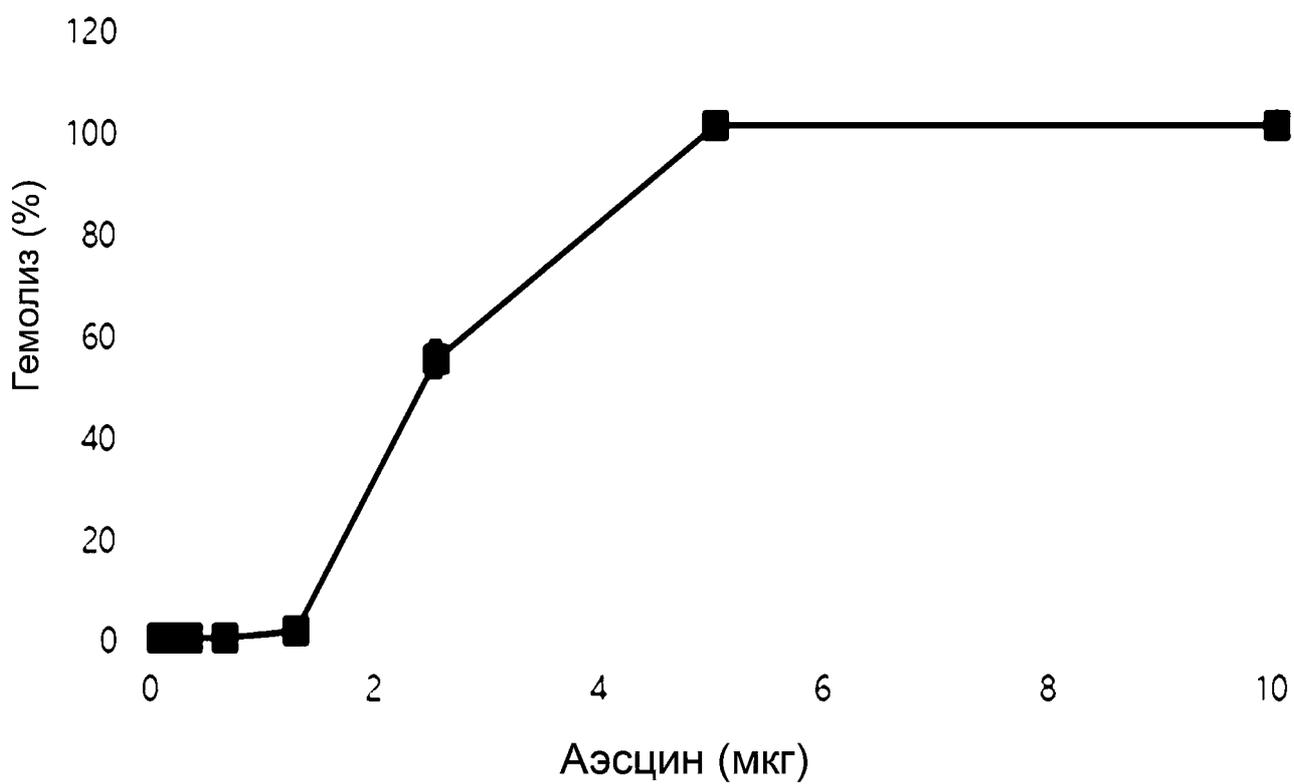


Фиг. 19



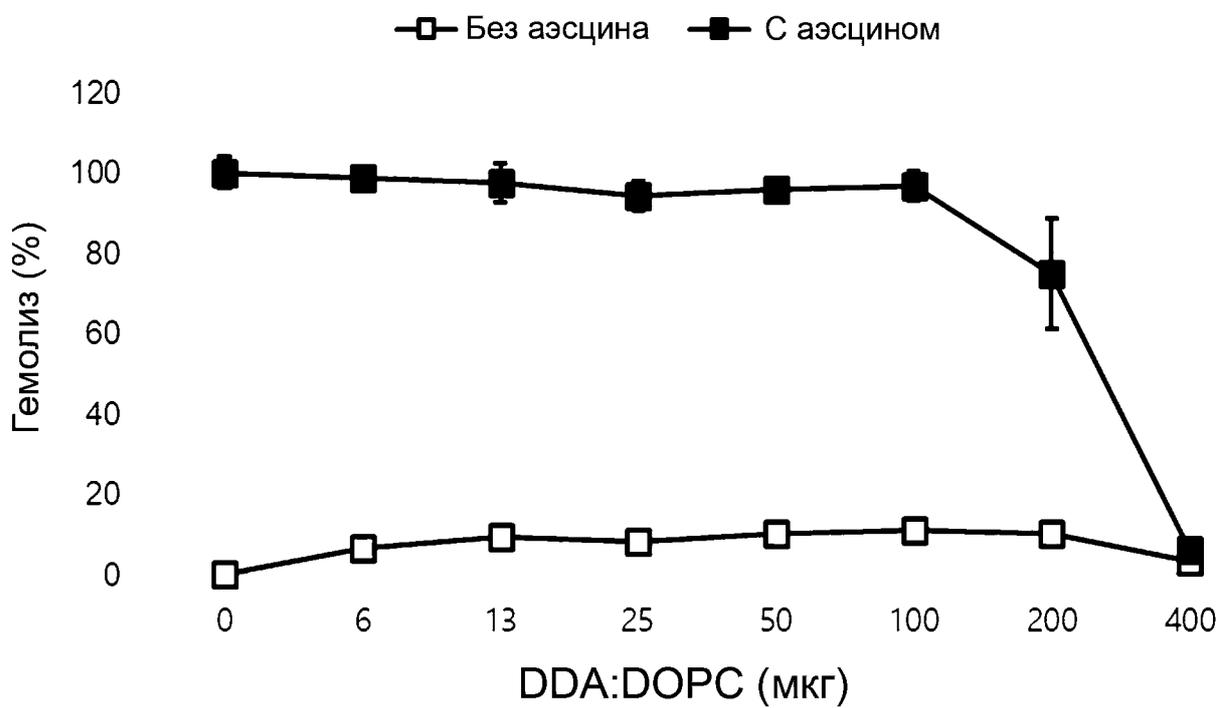
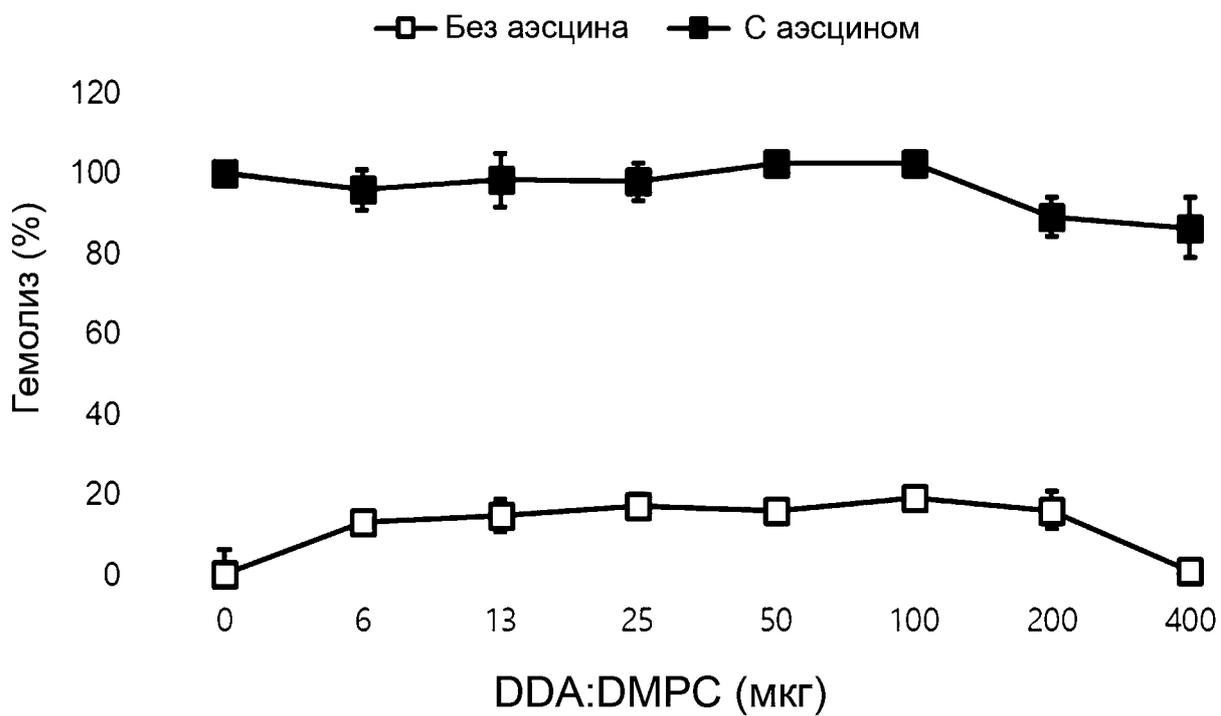
Фиг. 20

20/26

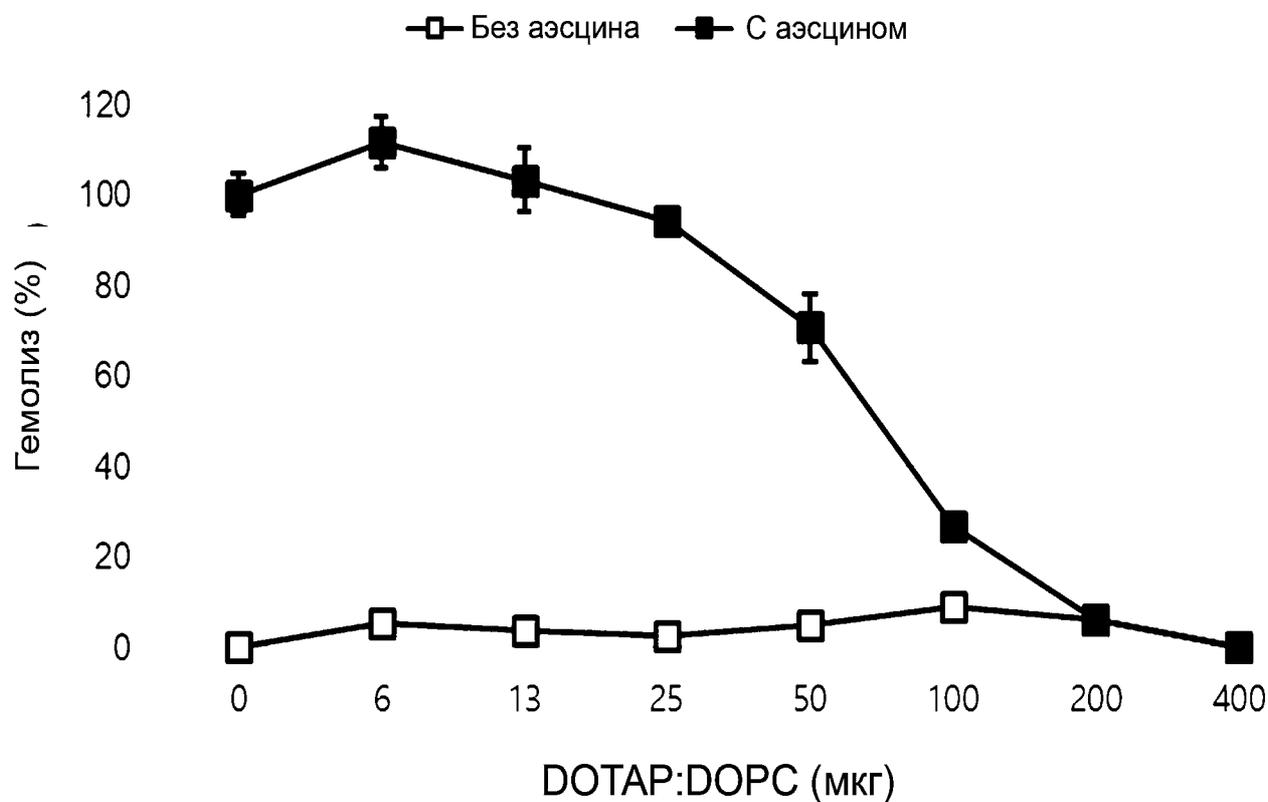
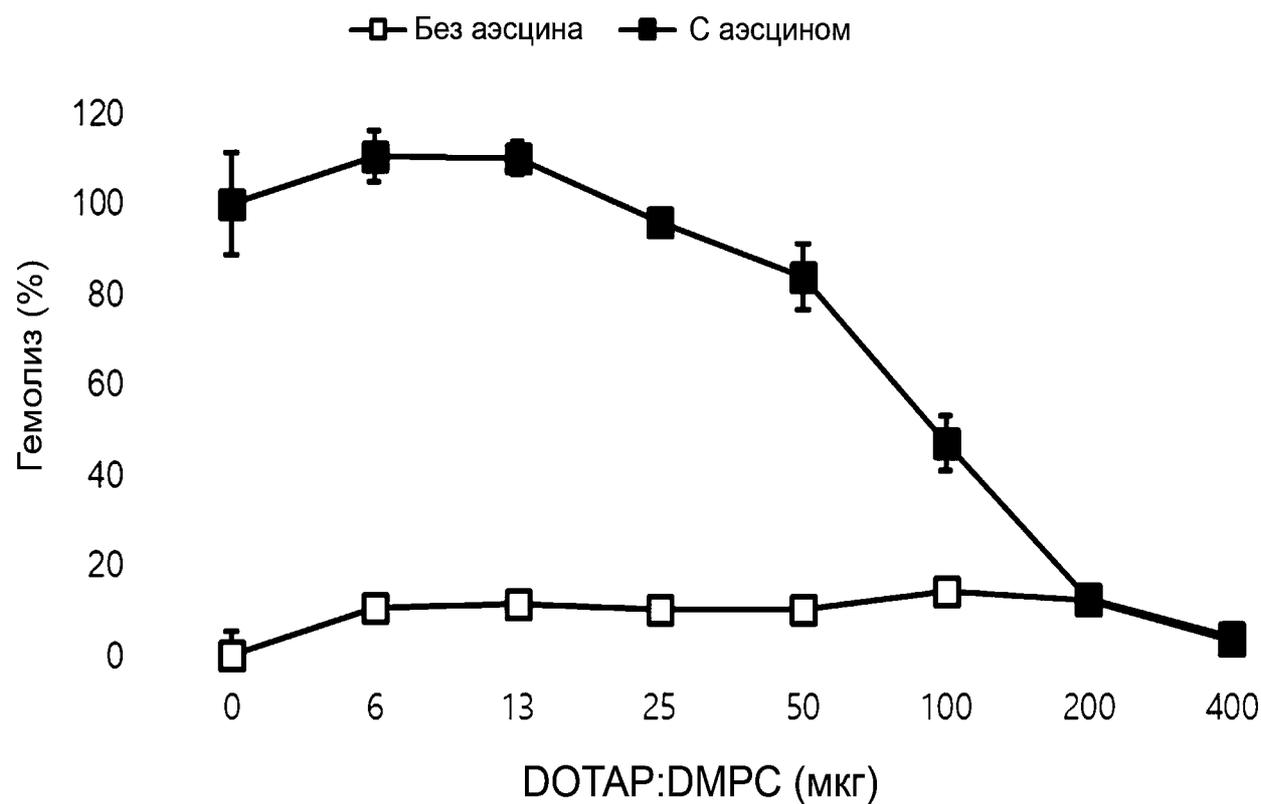


Фиг. 21

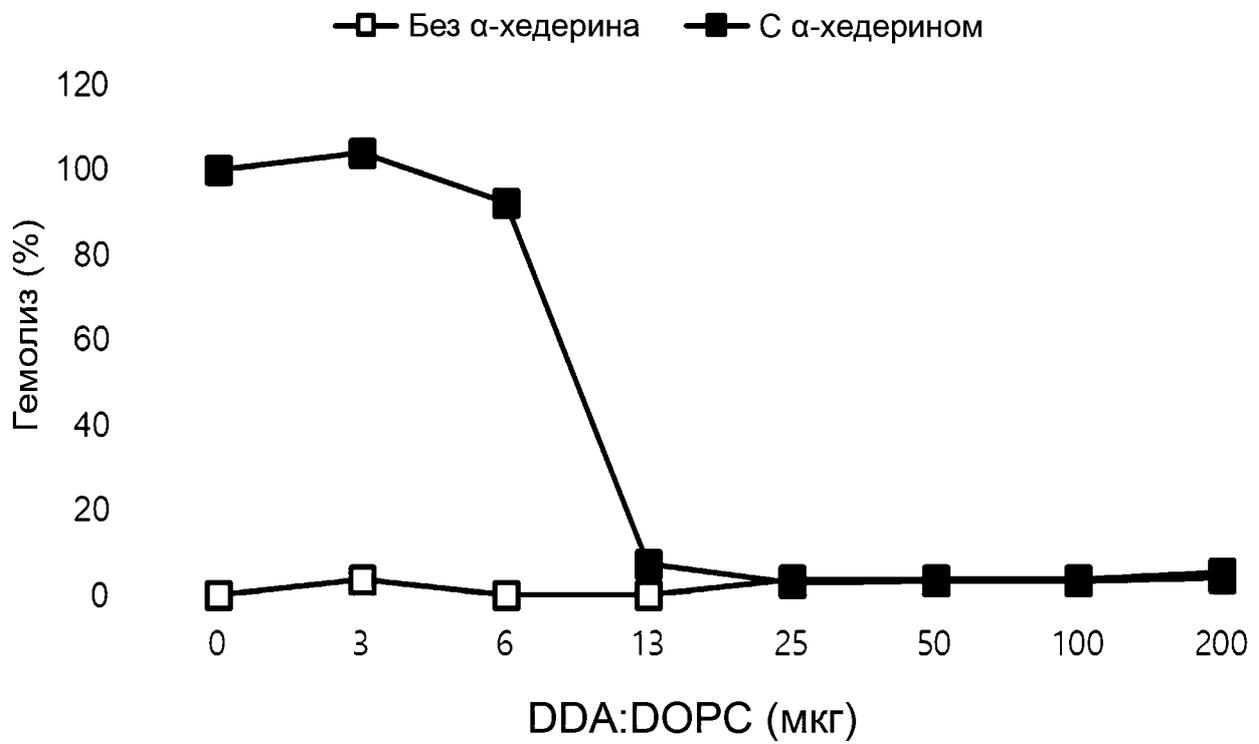
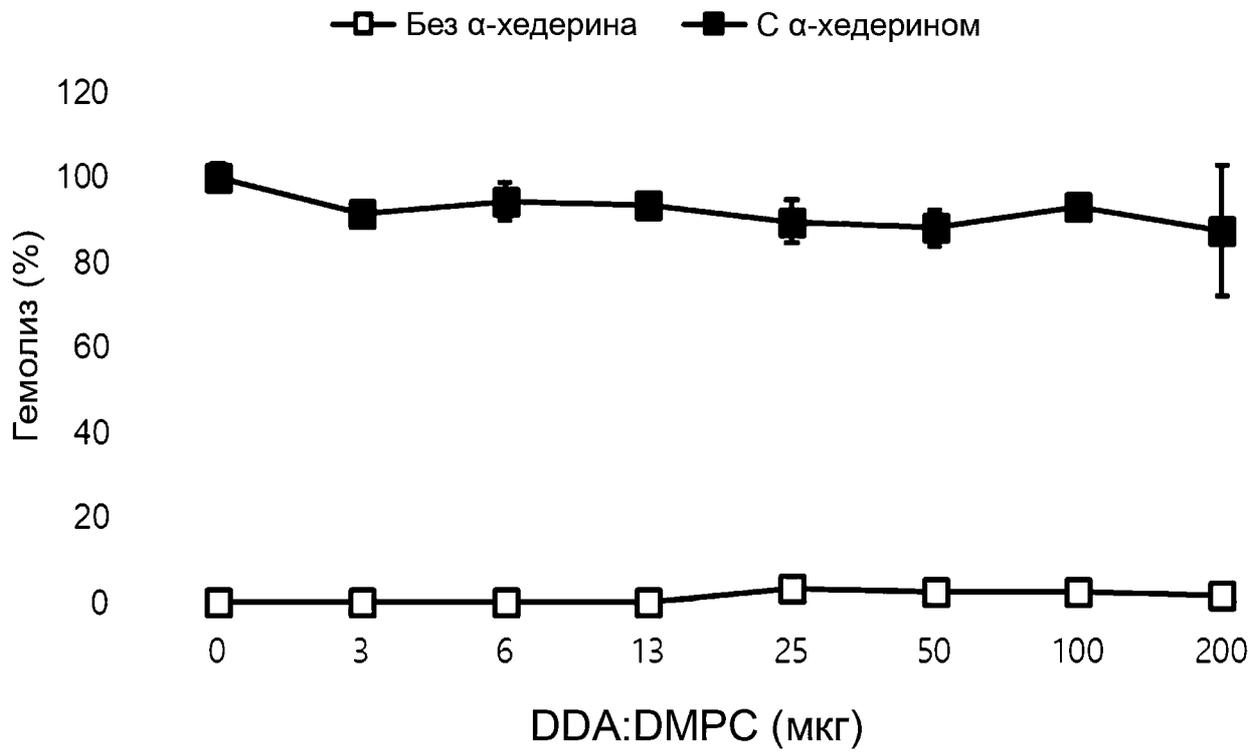
21/26



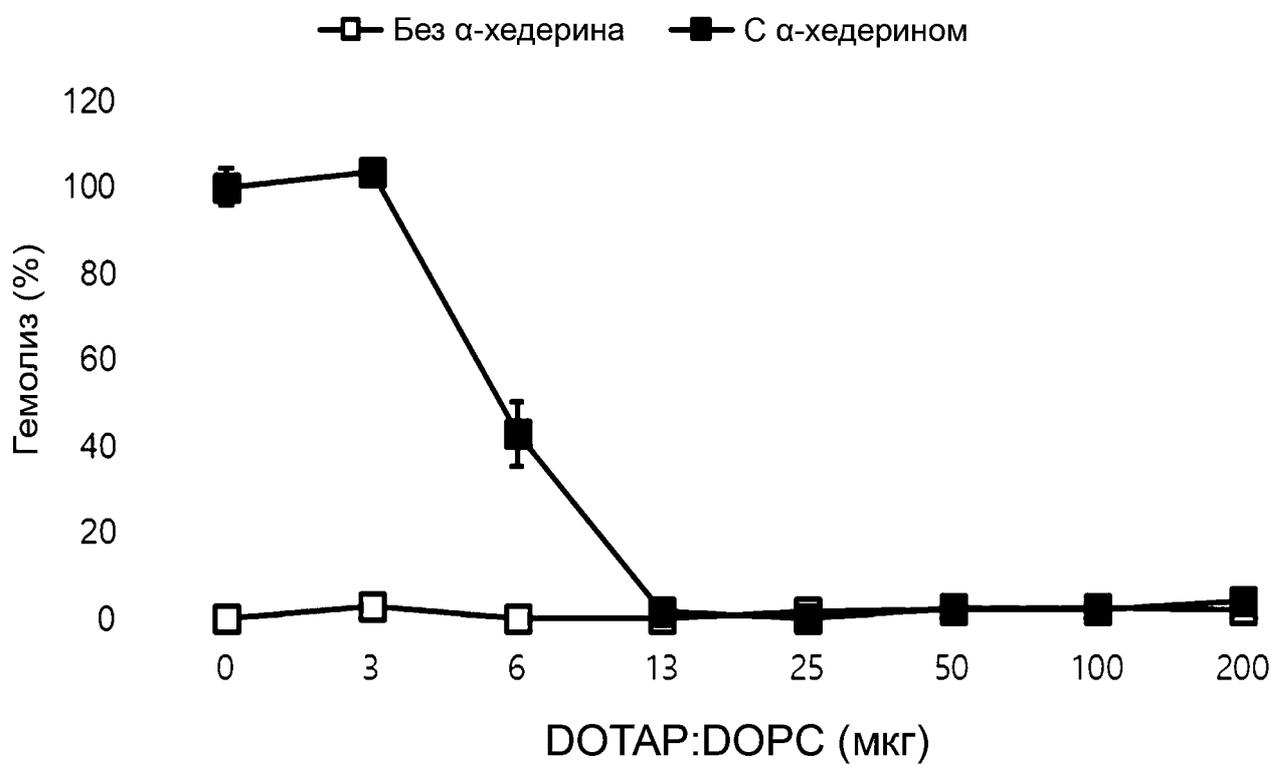
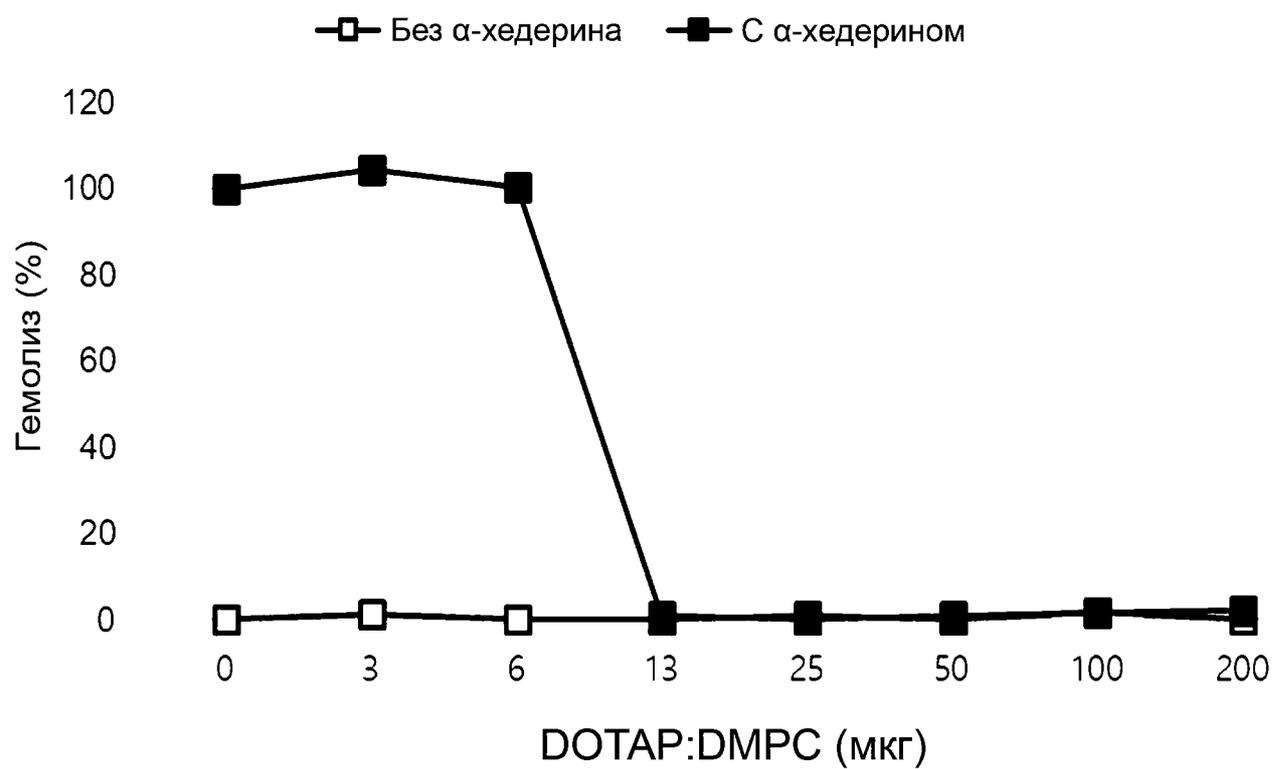
Фиг. 22



Фиг. 23



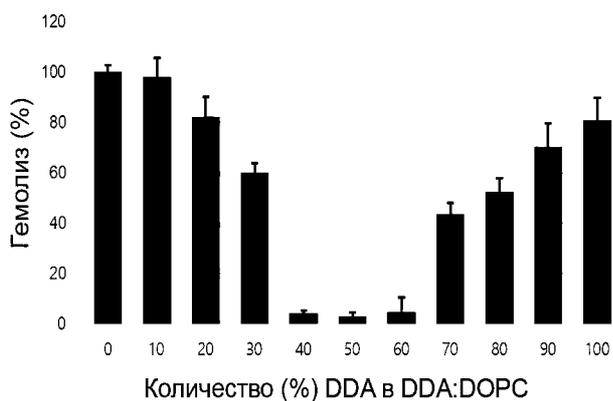
ФИГ. 24



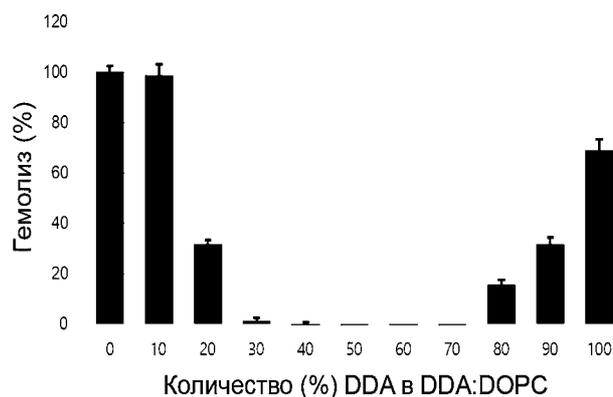
Фиг. 25

25/26

▶ 2,5 мкг дигитонина

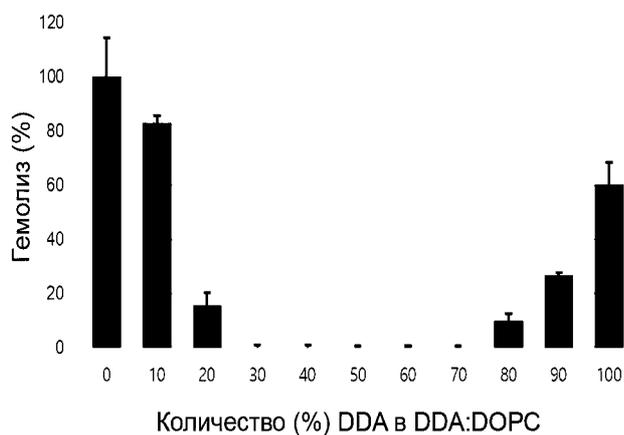


▶ 1,25 мкг α-хедерина

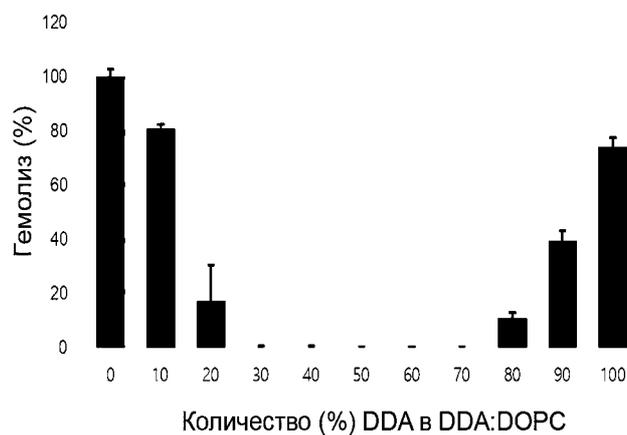


Фиг. 26

▶ 2,5 мкг неочищенного сапонина

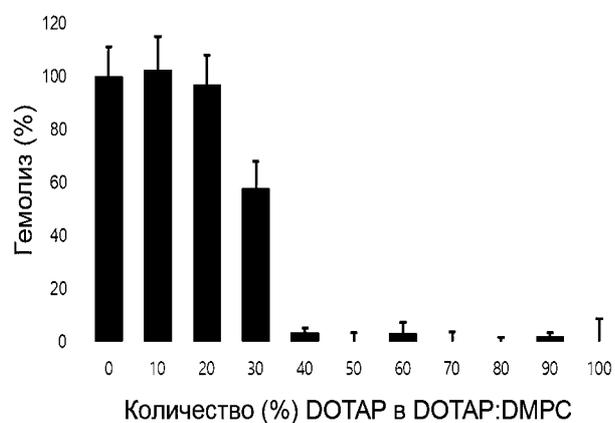


▶ 2,5 мкг QS21

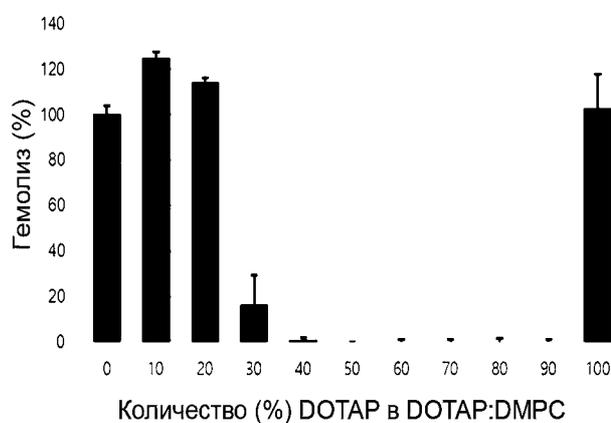


Фиг. 27

▶ 2,5 мкг дигитонина

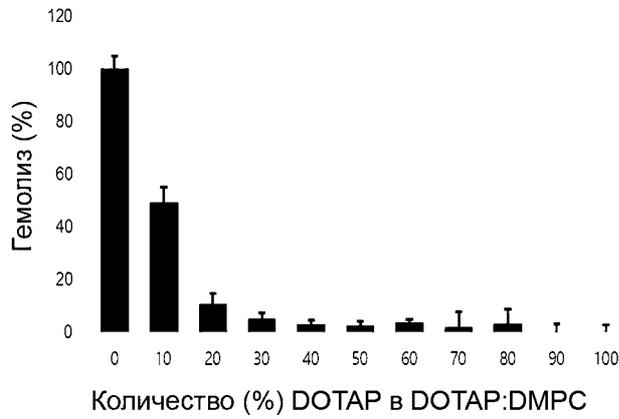


▶ 1,25 мкг α-хедерина

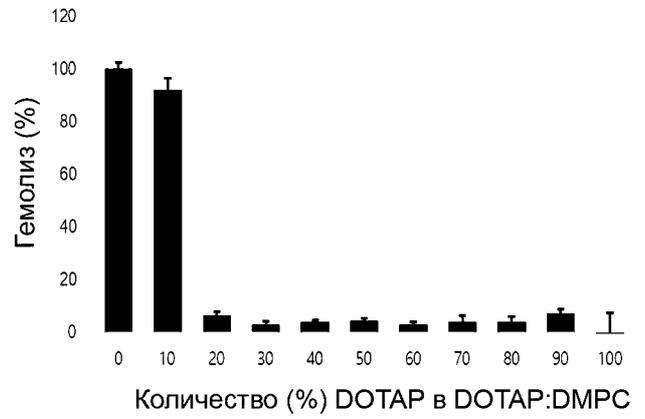


Фиг. 28

▶ 2,5 мкг неочищенного сапонины

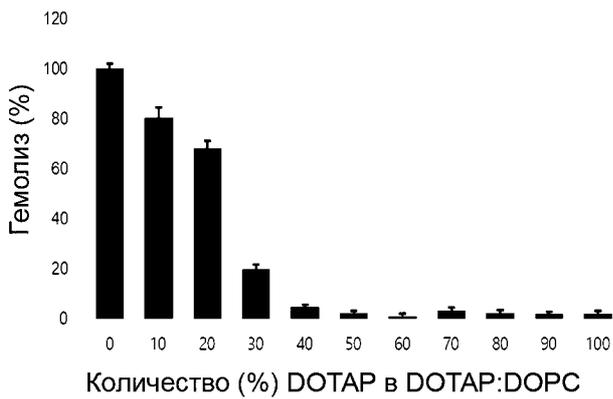


▶ 2,5 мкг QS21

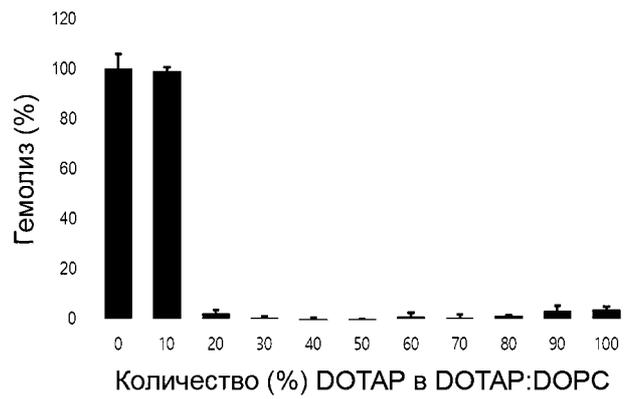


Фиг. 29

▶ 2,5 мкг дигитонина

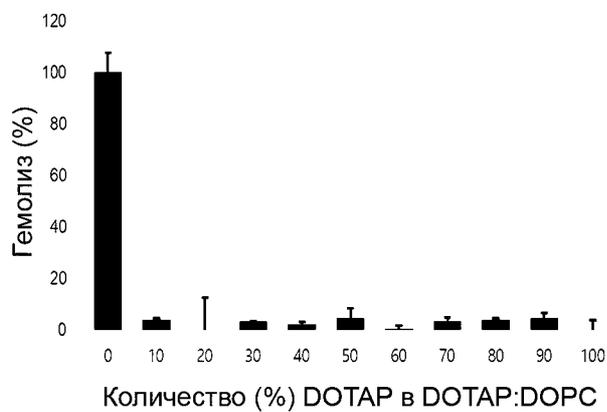


▶ 1,25 мкг α-хедерина

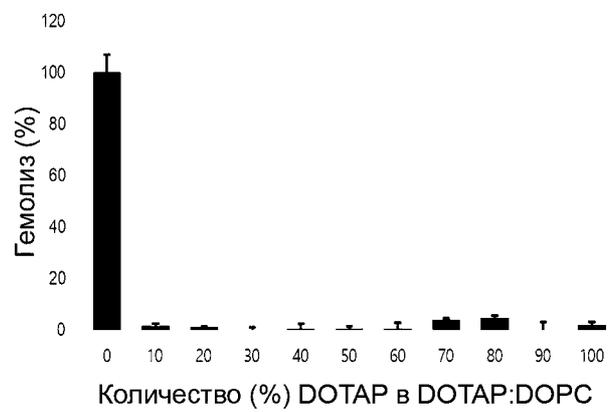


Фиг. 30

▶ 2,5 мкг неочищенного сапонины



▶ 2,5 мкг QS21



Фиг. 31