

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293252 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.13

(51) Int. Cl. A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.06

(54) ЛИПОСОМНЫЕ СОСТАВЫ

(31) 20184542.7

(32) 2020.07.07

(33) EP

(86) PCT/EP2021/068568

(87) WO 2022/008471 2022.01.13

(71) Заявитель:
ТЕРМОСОМ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Хоссани Мартин, Ведманн Барбара
Корнелия, Линднер Ларс Хартвин
(DE), Локерсе Ваутер Якобус Маринус
(SE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение предусматривает термочувствительные липосомы и составы на их основе предпочтительно для лечения, облегчения, задержки, излечения и/или предупреждения рака.

202293252

A1

A1

202293252

ЛИПОСОМНЫЕ СОСТАВЫ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области термочувствительных липосом и композиций на их основе, предпочтительно для лечения рака, более предпочтительно саркомы мягких тканей.

Предшествующий уровень техники

Для различных активных фармацевтических ингредиентов в качестве систем доставки лекарственного средства были предложены восприимчивые к стимулам наноносители, такие как термочувствительные липосомы (TSL). Yatvin с соавт. описали первый состав термочувствительных липосом, который высвобождал гидрофильный активный фармацевтический ингредиент при нагревании [1], на основе 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC).

Состав термочувствительных липосом на основе лизолипидов (LTSL), разработанный Needham и соавт. [2], прошел клинические испытания на людях (Thermodox®). Этот состав состоит из DPPC, 1-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (S-Lyso-PC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-метокси(PEG)-2000 (DSPE-PEG2000). Однако этот состав показал неудовлетворительную стабильность в кровяном русле.

Для преодоления этой проблемы со стабильностью разработали 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо-*rac*-олигоглицерин (PG_n). В 2004 г. была описана фосфолипидная композиция для термочувствительных липосом DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 (моль/моль) (DPPG₂-TSL_{30%}) [3]. Этот состав неоднократно сравнивали *in vitro* с составом LTSL. Однако не было исследовано, как достичь долгосрочного хранения этих составов [4,5].

Следовательно, в данной области техники имеется неудовлетворенная потребность в обеспечении систем доставки лекарственного средства на основе DPPG₂-TSL с подходящей стабильностью, что позволяет обеспечить производство в промышленных масштабах и длительное хранение. Задача доклинической разработки термочувствительных липосомальных составов для применения пациентами-людьми состоит, в частности, в получении стабильного и позволяющего осуществлять длительное хранение состава, не оказывая воздействия на желательную нестабильность при температурах >39°C для индуцированной теплом локализованной доставки лекарственного средства к солидным опухолям пациентов. Оптимальный состав должен выдерживать процесс производства в промышленных масштабах и храниться в течение длительного времени без изменения критичных для обеспечения качества характеристик, которые могут влиять на терапевтическую эффективность и безопасность для пациента.

Описание изобретения***Термочувствительная липосома***

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает термочувствительную липосому, содержащую бислою и внутрилипосомальный буфер, где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет по меньшей мере 15 процентов, где указанная термочувствительная липосома содержит активный фармацевтический ингредиент, и где молярное соотношение указанного активного фармацевтического ингредиента и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,05 до не более 0,3. Такие термочувствительные липосомы называются в настоящем документе липосомами согласно или по настоящему изобретению или же термочувствительными липосомами согласно или по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения молярная концентрация липида в бислое относится к соотношению молярного количества указанного липида к общему молярному количеству всех липидов, содержащихся в указанном бислое, если явно не определено иное.

Липосома представляет собой сферическую систему, содержащую по меньшей мере один бислою и внутрилипосомальный буфер, где указанный внутрилипосомальный буфер представляет собой водный раствор, который заключен в указанный бислою (см. фиг. 1). Как хорошо известно специалисту в данной области, бислою содержит два слоя амфифильных молекул, ориентированных таким образом, что супрамолекулярная структура бислоя характеризуется двумя гидрофильными поверхностями, разделенными гидрофобным средним слоем. Внутрилипосомальный буфер липосомы представлен любым водным раствором, заключенным в бислою, содержащийся в указанной липосоме. Внелипосомальный буфер представлен водным раствором, в котором диспергирована указанная липосома. Очевидно, что внутрилипосомальный буфер контактирует с вогнутой гидрофильной поверхностью бислоя, тогда как внелипосомальный буфер контактирует с выпуклой гидрофильной поверхностью бислоя.

Липосома может быть однослойной или многослойной. Однослойная липосома содержит только один бислою, заключающий внутрилипосомальный буфер, тогда как многослойная липосома содержит больше одного бислоя. В многослойной липосоме наружный бислою представляет собой бислою, в который заключены другие бислои, содержащиеся в указанной многослойной липосоме. В контексте многослойной липосомы внутрилипосомальный буфер относится к любому водному раствору, заключенному в наружный бислою. Предпочтительно бислои, содержащиеся в многослойной липосоме,

находятся в по сути концентрической конфигурации. Если ссылка сделана на «указанный бислой» или «бислой» в контексте многослойной липосомы, подразумевается наружный бислой.

Липиды представляют собой молекулы, которые растворимы в неполярных растворителях, таких как углеводороды. Если явно не указано иное, липиды в данном документе относятся к амфифильным или гидрофобным молекулам, содержащимся в бислое, которые растворимы в неполярных растворителях. В связи с этим термины бислой и липидный бислой используются взаимозаменяемо в контексте настоящей заявки. В контексте настоящей заявки амфифильные поверхностно-активные вещества представляют собой липиды. Термин липид предпочтительно относится только к небольшим молекулам, которые растворимы в неполярных растворителях, где небольшие молекулы характеризуются молекулярной массой менее чем 900 дальтонов. Согласно этому предпочтительному определению амфифильные или гидрофобные белки, характеризующиеся молекулярной массой более 900 дальтонов, содержащиеся в бислое, не являются липидами.

Очевидно, что (липидный) бислой может содержать нелипидные компоненты. (Липидный) бислой может содержать неамфифильные молекулы. Например, небольшие гидрофобные молекулы могут присутствовать в гидрофобном среднем слое бислоя или гидрофильные пептиды могут быть связаны с одной из гидрофильных поверхностей бислоя.

Липосому согласно настоящему изобретению можно получать посредством способа в соответствии с настоящим изобретением, как определено ниже.

Термочувствительность

Как хорошо известно специалисту в данной области, бислой не является статической структурой, и молекулы, содержащиеся в нем, способны перемещаться, т. е. сдвигаться и вращаться, в плоскости бислоя. Текучесть или подвижность мембраны относится к простоте, с которой это перемещение молекул в плоскости бислоя может происходить.

Бислой может существовать в жидкой фазе (жидкокристаллической фазе), которая характеризуется высокой текучестью, или в твердой фазе (гелевой фазе, твердой гелевой фазе), которая характеризуется низкой текучестью. Фаза, в которой бислой конкретного состава существует в конкретной среде, определяется главным образом температурой и идентичностью молекул, содержащихся в указанном бислое. В твердой фазе липиды, содержащиеся в указанном бислое, упорядочены структурированным образом,

напоминающим кристаллическую структуру, тогда как в жидкой фазе липиды не упорядочены и способны свободно диффундировать в плоскости бислоя.

Бислой конкретного состава, например, состоящий из конкретного набора липидов в конкретных молярных соотношениях, будет существовать в твердой фазе, если температура ниже температуры фазового перехода гель-жидкость, и будет существовать в жидкой фазе, если температура выше температуры фазового перехода гель-жидкость. В контексте настоящей заявки температура фазового перехода гель-жидкость также называется температурой перехода или $T_{пл}$. Температура перехода определяется главным образом идентичностью молекул, содержащихся в указанном бислое, и, следовательно, липидами, содержащимися в указанном бислое.

Температура перехода липида определяется как температура перехода термочувствительной липосомы, содержащей бислой, причем указанный бислой по сути состоит из указанного липида. В этом контексте «по сути состоит» означает, что молярная концентрация указанного липида в указанном бислое составляет по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%.

Если температура находится в пределах температуры фазового перехода гель-жидкость, то структура указанного бислоя содержит как свободно диффундирующие липиды, так и скопления упорядоченных липидов. Другими словами, структура указанного бислоя находится между структурой указанного бислоя при температуре ниже температуры перехода и структурой указанного бислоя при температуре выше температуры перехода. В контексте настоящей заявки диапазон значений температуры перехода бислоя представляет собой диапазон значений температуры, при которых указанный бислой характеризуется такой смешанной структурой. Очевидно, что диапазон значений температуры перехода содержит температуру перехода, и диапазон значений температуры перехода определяется главным образом липидами, содержащимися в указанном бислое.

Высвобождение активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению относится к переносу указанного активного фармацевтического ингредиента из указанной термочувствительной липосомы во внелипосомальный буфер. В данном случае подразумевается, что указанный перенос не означает перенос всех молекул указанного активного фармацевтического ингредиента во внелипосомальный буфер, а означает перенос заданного молярного процента, предпочтительно, как определено ниже, указанного активного фармацевтического ингредиента во внелипосомальный буфер. Предпочтительно указанный активный

фармацевтический ингредиент содержится во внутрилипосомальном буфере указанной термочувствительной липосомы, и перенос происходит из внутрилипосомального буфера во внелипосомальный буфер.

В предпочтительном варианте осуществления высвобождение активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы означает перенос по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97,5%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98,5%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% указанного активного фармацевтического ингредиента из указанной термочувствительной липосомы во внелипосомальный буфер в течение заданного периода времени. Предпочтительно указанный период времени составляет 30 минут, 25 минут, 20 минут, 15 минут, 14 минут, 13 минут, 12 минут, 11 минут, 10 минут, 9 минут, 8 минут, 7 минут, 6 минут, 5 минут, 285 секунд, 270 секунд, 255 секунд, 240 секунд, 225 секунд, 210 секунд, 195 секунд, 180 секунд, 165 секунд, 150 секунд, 135 секунд, 120 секунд, 105 секунд, 90 секунд, 75 секунд, 60 секунд, 60 секунд, 55 секунд, 50 секунд, 45 секунд, 40 секунд, 35 секунд, 30 секунд, 25 секунд, 20 секунд, 15 секунд, 10 секунд или 5 секунд.

В более предпочтительном варианте осуществления высвобождение активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы означает перенос по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97,5%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98,5%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или 100% указанного активного фармацевтического ингредиента из указанной термочувствительной липосомы во внелипосомальный буфер в течение 10 минут.

В еще более предпочтительном варианте осуществления высвобождение активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы означает перенос по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97,5%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98,5%, по меньшей мере

99%, по меньшей мере 99,5% или 100% указанного активного фармацевтического ингредиента из указанной термочувствительной липосомы во внелипосомальный буфер в течение 5 минут.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления высвобождение активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы означает перенос по меньшей мере 90% указанного активного фармацевтического ингредиента из указанной термочувствительной липосомы во внелипосомальный буфер в течение 5 минут.

Скорость переноса активного фармацевтического ингредиента количественно определяет скорость перемещения указанного активного фармацевтического ингредиента через бислой термочувствительной липосомы. Очевидно, что скорость переноса может зависеть от набора условий окружающей среды, таких как температура. Высвобождение активного фармацевтического ингредиента относится к свойству термочувствительной липосомы обладать высокой скоростью переноса активного фармацевтического ингредиента при заданном наборе условий, предпочтительно при температуре, выше заданной (см. ниже). Например, высвобождение доксорубина из термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению может происходить только при значениях температуры, находящихся в пределах температуры перехода бислоя, содержащегося в указанной термочувствительной липосоме, с обеспечением селективной в отношении тепла доставки противоракового лекарственного средства.

Как описано выше, высвобождение активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению предпочтительно происходит из внутрилипосомального буфера во внелипосомальный буфер. В контексте настоящей заявки загрузка активного фармацевтического ингредиента определяется как перенос указанного активного фармацевтического ингредиента из внелипосомального буфера во внутрилипосомальный буфер. Термины «высвобождение» и «загрузка» предпочтительно используются в отношении гидрофильных, растворимых в воде активных фармацевтических ингредиентов.

Предпочтительно указанные высвобождение и загрузка происходят посредством диффузии указанного активного фармацевтического ингредиента из внутрилипосомального буфера во внелипосомальный буфер или наоборот, при этом указанный активный фармацевтический ингредиент проходит через бислой без активного транспорта. Специалисту в данной области хорошо известно, что активный транспорт молекулы сквозь или через (липидный) бислой означает, что для указанного переноса требуются транспортные белки, содержащиеся в указанном бислое или связанные с ним.

Следует отметить, что активная загрузка не подразумевает активный транспорт. В контексте этого предпочтительного определения скорость переноса (посредством диффузии) зависит от проницаемости бислоя для указанного активного фармацевтического ингредиента. Указанная проницаемость зависит от характеристик указанного активного фармацевтического ингредиента, таких как размер, полярность, заряд и/или гидрофильность, и от плотности бислоя. Неплотность бислоя является свойственной бислою проницаемостью. Предпочтительно повышение или снижение плотности бислоя определяется в данной заявке как повышение или снижение проницаемости указанного бислоя соответственно для заданного активного фармацевтического ингредиента с заданным зарядом. Более предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой антибластомное средство, причем предпочтительно указанное антибластомное средство выбрано из группы, состоящей из иринотекана, производного иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и доксорубина, производного доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли. Наиболее предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль.

Неплотность бислоя, содержащегося в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, является важным параметром для использования указанной термочувствительной липосомы в фармацевтических применениях. Например, термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, содержащая доксорубин в качестве активного фармацевтического ингредиента, может применяться как система доставки лекарственного средства, если плотность бислоя, содержащегося в указанной термочувствительной липосоме, будет обеспечивать высвобождение указанного доксорубина в организме нуждающегося в этом пациента.

Термочувствительная липосома определяется в данной заявке как липосома, содержащая активный фармацевтический ингредиент, где указанный активный фармацевтический ингредиент не высвобождается при конкретной температуре или ниже ее, и где указанный активный фармацевтический ингредиент может высвобождаться за счет повышения температуры немного выше указанной температуры. Предпочтительно указанная температура представляет собой температуру тела человека. Предпочтительно указанная конкретная температура составляет от 36°C до не более 40°C, или от 36°C до не более 39°C, или от 36°C до не более 38°C, или от 36,5°C до не более 37,5°C. В данном контексте «немного выше» означает по меньшей мере на 1°C выше, или по меньшей мере на 1,1°C выше, или по меньшей мере на 1,2°C выше, или по меньшей мере на 1,3°C выше, или по

меньшей мере на 1,4°C выше, или по меньшей мере на 1,5°C выше, или по меньшей мере на 1,6°C выше, или по меньшей мере на 1,7°C выше, или по меньшей мере на 1,8°C выше, или по меньшей мере на 1,9°C выше, или по меньшей мере на 2°C выше, или по меньшей мере на 2,1°C выше, или по меньшей мере на 2,2°C выше, или по меньшей мере на 2,3°C выше, или по меньшей мере на 2,4°C выше, или по меньшей мере на 2,5°C выше, или по меньшей мере на 2,6°C выше, или по меньшей мере на 2,7°C выше, или по меньшей мере на 2,8°C выше, или по меньшей мере на 2,9°C выше, или по меньшей мере на 3°C выше, или по меньшей мере на 3,1°C выше, или по меньшей мере на 3,2°C выше, или по меньшей мере на 3,3°C выше, или по меньшей мере на 3,4°C выше, или по меньшей мере на 3,5°C выше, или по меньшей мере на 3,6°C выше, или по меньшей мере на 3,7°C выше, или по меньшей мере на 3,8°C выше, или по меньшей мере на 3,9°C выше, или по меньшей мере на 4°C выше, или по меньшей мере на 4,1°C выше, или по меньшей мере на 4,2°C выше, или по меньшей мере на 4,3°C выше, или по меньшей мере на 4,4°C выше, или по меньшей мере на 4,5°C выше, или по меньшей мере на 4,6°C выше, или по меньшей мере на 4,7°C выше, или по меньшей мере на 4,8°C выше, или по меньшей мере на 4,9°C выше, или по меньшей мере на 5°C выше.

В предпочтительном варианте осуществления термочувствительная липосома определяется как липосома, где указанный активный фармацевтический ингредиент не высвобождается при температуре тела человека или ниже ее, и где указанный активный фармацевтический ингредиент может высвободиться за счет повышения температуры выше 39°C, выше 39,1°C, выше 39,2°C, выше 39,3°C, выше 39,4°C, выше 39,5°C, выше 39,6°C, выше 39,7°C, выше 39,8°C, выше 39,9°C, выше 40°C, выше 40,1°C, выше 40,2°C, выше 40,3°C, выше 40,4°C, выше 40,5°C, выше 40,6°C, выше 40,7°C, выше 40,8°C, выше 40,9°C, выше 41°C, выше 41,1°C, выше 41,2°C, выше 41,3°C, выше 41,4°C, выше 41,5°C, выше 41,6°C, выше 41,7°C, выше 41,8°C, выше 41,9°C, выше 42°C, выше 42,1°C, выше 42,2°C, выше 42,3°C, выше 42,4°C, выше 42,5°C, выше 42,6°C, выше 42,7°C, выше 42,8°C, выше 42,9°C, выше 43°C, выше 43,1°C, выше 43,2°C, выше 43,3°C, выше 43,4°C, выше 43,5°C, выше 43,6°C, выше 43,7°C, выше 43,8°C, выше 43,9°C или выше 44°C.

В более предпочтительном варианте осуществления термочувствительная липосома определяется как липосома, где указанный активный фармацевтический ингредиент не высвобождается при температуре от 36,5°C до не более 37,5°C, и где указанный активный фармацевтический ингредиент может высвободиться за счет повышения температуры выше 40°C.

Без ограничения данной теорией перенос активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы, индуцируемый небольшим повышением температуры, может быть обусловлен переходом бислоя, содержащегося в указанной термочувствительной липосоме, из твердой фазы в гелевую. В этом контексте температура

5 перехода указанного бислоя является немного выше или ниже температуры, при которой указанный активный фармацевтический ингредиент не высвобождается. Свыше температуры перехода указанный активный фармацевтический ингредиент может высвобождаться за счет небольшого нагревания, как определено выше. В пределах температуры перехода бислой содержит как участки, которые находятся в твердой фазе, так

10 и участки, которые находятся в жидкой фазе. На границе этих фаз возникают дефекты упаковки липидов, что приводит к локально большей скорости диффузии активного фармацевтического ингредиента. Другими словами, вызванный температурой перенос активного фармацевтического ингредиента в термочувствительной липосоме может происходить через отверстия в липидном бислое, которые возникают в пределах

15 температуры перехода бислоя из-за дефектов упаковки. Неплотность бислоя является выше в пределах температуры перехода, чем когда бислой полностью находится в твердой фазе.

Активный фармацевтический ингредиент

Активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, представляет собой, как понятно

20 специалисту в данной области, молекулу, которая является биологически или клинически активной и ответственной за терапевтический эффект (т. е. фармакодинамический эффект), связанный с указанной термочувствительной липосомой или с композицией, содержащей указанную термочувствительную липосому. В данном контексте термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению может быть предусмотрена как система

25 доставки лекарственного средства для указанного активного фармацевтического ингредиента. Предпочтительно указанный терапевтический эффект представляет собой лечение, облегчение состояния, задержку, излечение и/или предупреждение рака, более предпочтительно саркомы мягких тканей.

Чистоту и концентрацию активных фармацевтических ингредиентов, содержащихся в

30 термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, можно определять с помощью ВЭЖХ, как описано в примере 1.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент содержится в указанном внутрилипосомальном буфере.

В другом предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 99,5%, или по меньшей мере 99,9% указанного активного фармацевтического ингредиента содержится в указанном внутрилипосомальном буфере.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент является гидрофильным и/или растворимым в воде. Предпочтительно «растворимый в воде» означает растворимость, составляющую по меньшей мере 100 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л, 400 мг/л, 500 мг/л, 600 мг/л, 700 мг/л, 800 мг/л, 900 мг/л, 1000 мг/л, 1500 мг/л, 2000 мг/л, 2500 мг/л, 3000 мг/л, 3500 мг/л, 4000 мг/л, 4500 мг/л, 5000 мг/л, 10000 г/л, 20000 г/л, 30000 г/л, 40000 г/л или по меньшей мере 50000 г/л, в воде при 25°C.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой антибластомное средство, где предпочтительно указанное антибластомное средство содержится во внутрилипосомальном буфере, содержащемся в указанной термочувствительной липосоме.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из антрациклинов, таких как доксорубин, даунорубин, идарубин, эпирубин, акларубин, амрубин, пирарубин, валрубин и зорубин; антрацендионов, таких как митоксантрон и пиксантрон; противоопухолевых антибиотиков, таких как митомицин и блеомицин; алкалоидов барвинка, таких как винбластин, винкрестин и винорелбин; алкилирующих средств, таких как циклофосфамид и гидрохлорид мехлорэтамину; камптотецинов, таких как топотекан, иринотекан (CPT-11), лурботекан, 9-аминокамптотецин, 9-нитрокамптотецин и 10-гидроксикамптотецин; производных пурина и пиримидина, таких как 5-фторурацил, гемцитабин (2',2'-дифтор-2'-дезоксцитидин, dFdC), флоксуридин (FUDR), цитарабин (арабинозид цитозина), 6-азаурацил (6-AU); оксазафосфоринов, таких как циклофосфамид, ифосфамид и трофосфамид; таксанов, таких как паклитаксел и доцетаксел; производных подофиллотоксина, таких как этопосид и

тенипозид; соединений на основе платины, таких как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин; метотрексата; ингибиторов тирозинкиназы, таких как иматиниб, гефитиниб, эрлотиниб, сунитиниб, адавосертиб и лапатиниб; и цитарабинов, таких как цитозинарабинозид.

5 В еще более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубицина, даунорубицина, митоксантрона, идарубицина, эпирубицина, акларубицина, амрубицина, пирурубицина, валрубицина, зорубицина, пиксантрона, митомицина, блеомицина, 10 винбластина, винкристина, винорелбина, циклофосфамида, гидрохлорида мехлорэтаммина, топотекана, иринотекана, луртотекана, 9-аминокамптотецина, 9-нитрокамптотецина, 10-гидроксикамптотецина, 5-фторурацила, гемцитабина, флоксуридина, цитарабина, 6-азаурацила, циклофосфамида, ифосфамида, трофосфамида, паклитаксела, доцетаксела, этопсида, тенипозид, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, 15 метотрексата, иматиниба, гефитиниба, эрлотиниба, сунитиниба, адавосертиба, лапатиниба и цитозинарабинозида.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубицина, иринотекана, гемцитабина и их фармацевтически приемлемых солей, более 20 предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубицина, иринотекана и их фармацевтически приемлемых солей, наиболее предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубидин.

25 В контексте настоящей заявки активный фармацевтический ингредиент относится к нейтральной форме, и всем фармацевтически приемлемым цвиттер-ионным формам, и всем фармацевтически приемлемым солям указанного активного фармацевтического ингредиента. Например, применение термина «доксорубидин» в данном документе относится к по меньшей мере нейтральному доксорубину и гидрохлориду 30 доксорубицина. В качестве другого примера применение термина «иринотекан» в данном документе относится к по меньшей мере нейтральному иринотекану и гидрохлориду иринотекана.

Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению может содержать больше одного активного фармацевтического ингредиента. Предпочтительно

предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, содержащая доксорубин или его фармацевтически приемлемую соль, и/или иринотекан или его фармацевтически приемлемую соль, и/или гемцитабин или его фармацевтически приемлемую соль.

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09. Предпочтительно представлена термочувствительная липосома согласно данному варианту осуществления,

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и/или
- 15 - где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или
- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), более
- 20 предпочтительно
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина
 - 25 (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и/или
- где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂)
- 30 представлен формулой (IV).

В контексте настоящей заявки производное доксорубина предпочтительно представляет собой антрациклин, такой как даунорубин, митоксантрон, идарубин, эпирубин, акларубин, амрубин, пирарубин, валрубин или зорубин, или антрацендион, такой как митоксантрон или пиксантрон, наиболее предпочтительно

производное доксорубицина представляет собой антрациклин. В свете этого доксорубицин, производное доксорубицина или его фармацевтически приемлемая соль предпочтительно представляет собой антрациклин или антрацендион или их фармацевтически приемлемую соль, более предпочтительно антрациклин или его фармацевтически приемлемую соль.

5 Очевидно, что доксорубицин рассматривается как антрациклин.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение иринотекана, указанного

10 производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20. Предпочтительно предусмотрена термочувствительная липосома согласно данному варианту осуществления,

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100
- 15 нанометров до не более 150 нанометров; и/или
- где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или
- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин
- 20 (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), более предпочтительно
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и/или
 - 25 ○ где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и/или
- 30 - где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV),
- где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет менее чем 0,3.

В контексте данной заявки производное иринотекана предпочтительно представляет собой камптотецин, такой как топотекан, луртотекан, 9-аминокамптотецин, 9-нитрокамптотецин или 10-гидроксикамптотецин. В свете этого иринотекана, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемая соль предпочтительно представляет собой камптотецин или его фармацевтически приемлемую соль. Очевидно, что иринотекана рассматривается как камптотецин.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15. Предпочтительно предусмотрена термочувствительная липосома согласно данному варианту осуществления,

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и/или
- где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или
- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), более предпочтительно
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и/или
- где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV),

- где предпочтительно молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет менее чем 0,3.

В контексте настоящей заявки производное гемцитабина предпочтительно представляет собой пурин или производное пиримидина, такое как 5-фторурацил (5FU), флоксурин (FUDR), цитарабин (цитозинарабинозид) или 6-азаурацил (6-AU), более предпочтительно производное пиримидина. В свете этого гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемая соль предпочтительно представляет собой пурин, производное пиримидина или его фармацевтически приемлемую соль, более предпочтительно производное пиримидина или его фармацевтически приемлемую соль. Очевидно, что гемцитабин рассматривается как производное пиримидина.

Диаметр и дзета-потенциал термочувствительных липосом

Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, характеризующаяся заданным диаметром, представляет собой термочувствительную липосому с размером частицы на основе площади, который больше указанного диаметра в 0,95 раза и меньше указанного диаметра в 1,05 раза, который предпочтительно больше указанного диаметра в 0,975 раза и меньше указанного диаметра в 1,025 раза, который еще более предпочтительно больше указанного диаметра в 0,99 раза и меньше указанного диаметра в 1,001 раза, причем наиболее предпочтительно указанный размер частиц на основе площади равен указанному диаметру.

Присутствие термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению с заданным диаметром в популяции термочувствительных липосом может определяться посредством динамического рассеяния света. Предпочтительно термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению с заданным диаметром относится к среднему диаметру z , определяемому посредством динамического рассеяния света. В примере 1 описывается такой способ, где используется прибор DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Вустершир, Великобритания). Этот прибор был откалиброван с помощью размерного стандарта NanosphereTM (125 нм, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром по меньшей мере 100 нанометров.

В другом предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанная

термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 250 нанометров, или от 100 нанометров до не более 200 нанометров, или от 100 нанометров до не более 150 нанометров, или от 110 нанометров до не более 140 нанометров, или от 115 нанометров до не более 135 нанометров, или от 120 нанометров до не более 130 нанометров.

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 200 нанометров, где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, и где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров, где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,07 до не более 0,09, и где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 6,4 до не более 8,0.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров. Предпочтительно предусмотрена термочувствительная липосома согласно данному варианту осуществления,

- где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина, производного доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана, производного иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина, производного гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, где более предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, и где указанный активный фармацевтический ингредиент содержится во внутрилипосомальном буфере, более предпочтительно

- где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09,
- 5
 - где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20,
 - где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15; и/или
- 10
 - где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- 15
 - где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или
 - где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), более предпочтительно
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и/или
 - где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).
- 20
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и/или
- 25
 - где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, характеризующаяся

30 дзета-потенциалом заданного значения, представляет собой термочувствительную липосому с дзета-потенциалом, который в 0,95 раза больше указанного значения и в 1,05 раза меньше указанного значения, который предпочтительно в 0,975 раза больше указанного значения и в 1,025 раза меньше указанного значения, который еще более предпочтительно в 0,99 раза больше указанного значения и в 1,001 раза меньше указанного

значения, причем наиболее предпочтительно указанный размер частиц на основе площади равен указанному значению.

Присутствие термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, характеризующейся заданным дзета-потенциалом, в популяции термочувствительных липосом можно определять посредством использования прибора DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Вустершир, Великобритания) после разбавления образцов в физиологическом растворе.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, характеризующаяся дзета-потенциалом от -40 мВ до не более -10 мВ, предпочтительно от -35 мВ до не более -20 мВ.

pH внутрилипосомального буфера

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5,0 до не более 8,0, от 5,5 до не более 8,0, от 6,0 до не более 8,0, от 6,5 до не более 8,0, от 7,0 до не более 8,0 или от 7,0 до не более 7,5. В контексте настоящей заявки pH можно измерять с помощью pH-метра, откалиброванного с помощью эталонного стандартного раствора с известным pH при калибровке по двум точкам.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5,0 до 8,0, и где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, или где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, или где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов в указанном бислое составляет по меньшей мере 0,12.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 6,0 до 8,0, и где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,07 до не более 0,09, или где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и

липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,20, или где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,15.

5 В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется рН от 6,0 до не более 8,0. Предпочтительно предусмотрена термочувствительная липосома согласно данному варианту осуществления,

10 - где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и/или

- где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина, указанного производного доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана, производного иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина, производного гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, где более предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, и где указанный активный фармацевтический ингредиент содержится во внутрилипосомальном буфере, более предпочтительно

25 ○ где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09,

○ где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20,

30 ○ где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15; и/или

- где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или

- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), более предпочтительно
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и/или
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и/или
- где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

Липидный состав бислоя

Композиция бислоя, содержащегося в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, определяет характеристики вызванного температурой высвобождения и стабильности указанной термочувствительной липосомы и, следовательно, определяет фармакокинетические свойства указанной термочувствительной липосомы. Как идентичность липидов, содержащихся в указанном бислое, так и их соотношения важны с этой точки зрения. Как описано в примере 1, композицию бислоя можно определять с помощью ТСХ, а чистоту и концентрации липидов, содержащихся в бислое, можно определять с помощью ВЭЖХ.

Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению имеет бислой, содержащий DPPG₂. Без ограничения данной теорией присутствие DPPG₂, содержащего сильно гидратированную группу диглицерина, в указанном бислое стерически ингибирует взаимодействия с компонентами крови как посредством электростатических, так и гидрофобных взаимодействий, тем самым делая указанную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению нетоксичной, как определено ниже.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где молярная концентрация указанного DPPG₂ в указанном бислое составляет по меньшей мере 15%, или по меньшей мере 16%, или по меньшей мере 17%, или по меньшей мере 18%, или по меньшей мере 19%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере 21%, или по меньшей мере 22%, или по меньшей мере 23%, или по меньшей мере 24%, или по меньшей мере 25%, или по меньшей мере 26%,

или по меньшей мере 27%, или по меньшей мере 28%, или по меньшей мере 29%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 31%, или по меньшей мере 32%, или по меньшей мере 33%, или по меньшей мере 34%, или по меньшей мере 35%.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где молярная концентрация DPPG₂ в указанном бислое составляет менее чем 55%, или менее чем 54%, или менее чем 53%, или менее чем 52%, или менее чем 51%, или менее чем 50%, или менее чем 49%, или менее чем 48%, или менее чем 47%, или менее чем 46%, или менее чем 45%, или менее чем 44%, или менее чем 43%, или менее чем 42%, или менее чем 41%, или менее чем 40%, или менее чем 39%, или менее чем 38%, или менее чем 37%, или менее чем 36%, или менее чем 35%, или менее чем 34%, или менее чем 33%, или менее чем 32%, или менее чем 31%, или менее чем 30%, или менее чем 29%, или менее чем 28%, или менее чем 27%, или менее чем 26%, или менее чем 25%, или менее чем 24%, или менее чем 23%, или менее чем 22%, или менее чем 21%, или менее чем 20%, или менее чем 19%, или менее чем 18%, или менее чем 17%, или менее чем 16%.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где концентрация указанного DPPG₂ в указанном бислое составляет по меньшей мере 15%, или от 15% до не более 55%, или от 15% до не более 54%, или от 15% до не более 53%, или от 15% до не более 52%, или от 15% до не более 51%, или от 15% до не более 50%, или от 15% до не более 49%, или от 15% до не более 48%, или от 15% до не более 47%, или от 15% до не более 46%, или от 15% до не более 45%, или от 15% до не более 44%, или от 15% до не более 43%, или от 15% до не более 42%, или от 15% до не более 41%, или от 15% до не более 40%, или от 15% до не более 39%, или от 15% до не более 38%, или от 15% до не более 37%, или от 15% до не более 36%, или от 15% до не более 35%, или от 15% до не более 34%, или от 15% до не более 33%, или от 15% до не более 32%, или от 15% до не более 31%, или от 15% до не более 30%, или от 15% до не более 29%, или от 15% до не более 28%, или от 15% до не более 27%, или от 15% до не более 26%, или от 15% до не более 25%, или от 15% до не более 24%, или от 15% до не более 23%, или от 15% до не более 22%, или от 15% до не более 21%, или от 15% до не более 20%, или от 15% до не более 19%, или от 15% до не более 18%, или от 15% до не более 17%, или от 15% до не более 16%.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где концентрация указанного DPPG₂ в указанном бислое составляет от 15% до не более 40%, от 16% до не более 40%, от 17% до

не более 40%, от 18% до не более 40%, от 19% до не более 40%, от 20% до не более 40%, от 21% до не более 40%, от 22% до не более 40%, от 23% до не более 40%, от 24% до не более 40%, от 25% до не более 40%, от 26% до не более 40%, от 27% до не более 40%, от 28% до не более 40%, от 29% до не более 40%, от 30% до не более 40%, от 15% до не более 35%, от 16% до не более 35%, от 17% до не более 35%, от 18% до не более 35%, от 19% до не более 35%, от 20% до не более 35%, от 21% до не более 35%, от 22% до не более 35%, от 23% до не более 35%, от 24% до не более 35%, от 25% до не более 35%, от 26% до не более 35%, от 27% до не более 35%, от 28% до не более 35%, от 29% до не более 35%, от 30% до не более 35%.

10 Бислой, содержащийся в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, предпочтительно содержит фосфолипиды, более предпочтительно глицерофосфолипиды.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой содержит 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (PE), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (PC), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилсерин (PS), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилинозит (PI), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилинозита фосфат (PIP), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилинозита бифосфат (PIP₂), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилинозита трифосфат (PIP₃), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилглицерин (PG), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (PG₂), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилтриглицерин (PG₃) и/или 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилтетраглицерин (PG₄). Как объяснено выше, термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению содержит 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂), конкретный тип PG₂ согласно определению.

25 В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (PC), 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (PE) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂), имеющие общую концентрацию, составляющую по меньшей мере 50 мол. %, по меньшей мере 60 мол. %, по меньшей мере 70 мол. %, по меньшей мере 80 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 91 мол. %, по меньшей мере 92 мол. %, по меньшей мере 93 мол. %, по меньшей мере 94 мол. %, по меньшей мере 95 мол. %, по меньшей мере 96 мол. %, по меньшей мере 97 мол. %, по меньшей мере 98 мол. % или по меньшей мере 99 мол. %, содержатся в указанном бислое.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин (PC) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂) имеют общую концентрацию по меньшей мере 50 мол. %, по меньшей мере 60 мол. %, по меньшей мере 70 мол. %, по меньшей мере 80 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 91 мол. %, по меньшей мере 92 мол. %, по меньшей мере 93 мол. %, по меньшей мере 94 мол. %, по меньшей мере 95 мол. %, по меньшей мере 96 мол. %, по меньшей мере 97 мол. %, по меньшей мере 98 мол. % или по меньшей мере 99 мол. % в указанном бислое.

(Глицеро)фосфолипиды, описанные в данном документе, могут быть ковалентно присоединены к полиэтиленгликолю (PEG), глицерину или полиглицерину для повышения молекулярной массы и молекулярного размера гидрофильной части указанных (глицеро)фосфолипидов. В случае PEG такой (глицеро)фосфолипид указан как PEGилированный. Например, DSPE-PEG₂₀₀₀ представляет собой N-метокси(PEG)-2000-1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (PE). Без ограничения этой теорией присутствие PEGилированных (глицеро)фосфолипидов в термочувствительной липосоме оказывает подобный эффект, что и присутствие DPPG₂, описанного выше, а именно стерическое ингибирование взаимодействий с компонентом крови.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой не содержит PEG. Другими словами, такой бислой не содержит PEGилированные липиды.

Важным преимуществом применения DPPG₂ по сравнению с PEGилированными липидами является значительно меньшая модификация концевой группы фосфолипидного якоря (74 Да для каждого глицеринового звена по сравнению с приблизительно 2000 Да). В результате 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) образует ламеллярные, а не мицеллярные структуры и может, таким образом, быть включен в термочувствительную липосому в количестве не более чем 70 мол. %. С другой стороны, включение DSPE-PEG₂₀₀₀ ограничено, поскольку он выполняет функцию поверхностно-активного вещества при критической мицеллярной концентрации 0,5-1,0 мкМ, а при высоких концентрациях ухудшает стабильность мембранного бислоя.

В (глицеро)фосфолипидах, упомянутых выше, предпочтительные ацильные группы представляют собой C14-C22-ацильные группы, более предпочтительно C18-20-ацильные группы. Предпочтительно ацильная группа выбрана из группы, состоящей из арахидила, арахила, бегенила, брассидила, церила, цетила, элаидила, эруцила, гадолеила, геддила,

изостеарила, лаурила, лигноцерила, монтанила, мирицила, миристила, олеила, пальмитолеила, пальмитоила, петроселинила и стеарила. Более предпочтительно ацильные группы выбраны из группы, состоящей из стеарила и пальмитоила. Наиболее предпочтительно ацильная группа представляет собой пальмитоил.

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DPPE), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE), N-метокси(PEG)-2000-1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG₂₀₀₀) и/или 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂).

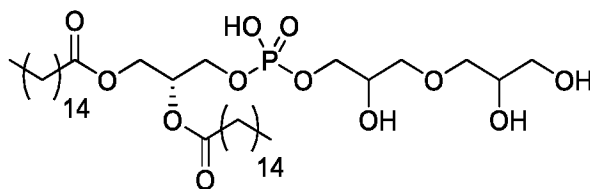
В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DPPE), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE), N-метокси(PEG)-2000-1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG₂₀₀₀) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂) имеют общую концентрацию по меньшей мере 50 мол. %, по меньшей мере 60 мол. %, по меньшей мере 70 мол. %, по меньшей мере 80 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 91 мол. %, по меньшей мере 92 мол. %, по меньшей мере 93 мол. %, по меньшей мере 94 мол. %, по меньшей мере 95 мол. %, по меньшей мере 96 мол. %, по меньшей мере 97 мол. %, по меньшей мере 98 мол. % или по меньшей мере 99 мол. % в указанном бислое. В контексте данного варианта осуществления понятно, что не все липиды, упомянутые выше, могут, но не должны содержаться в 20 указанной термочувствительной липосоме.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE), N-метокси(PEG)-2000-1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG₂₀₀₀) и/или 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂).

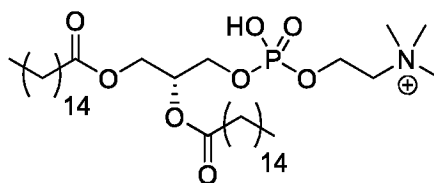
В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC), 1,2-

дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE), N-метокси(PEG)-2000-1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG₂₀₀₀) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂) имеют общую концентрацию по меньшей мере 50 мол. %, по меньшей мере 60 мол. %, по меньшей мере 70 мол. %, по меньшей мере 80 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 91 мол. %, по меньшей мере 92 мол. %, по меньшей мере 93 мол. %, по меньшей мере 94 мол. %, по меньшей мере 95 мол. %, по меньшей мере 96 мол. %, по меньшей мере 97 мол. %, по меньшей мере 98 мол. % или по меньшей мере 99 мол. % в указанном бислое. В контексте данного варианта осуществления понятно, что не все липиды, упомянутые выше, могут, но не должны содержаться в указанной термочувствительной липосоме.

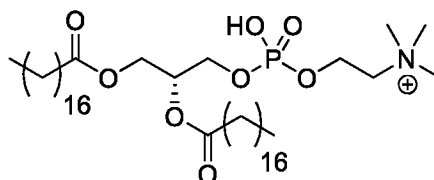
В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC). Специалисту в данной области понятно, что DPPG₂ относится ко всем соединениям, представленным формулой (I); DPPC относится ко всем соединениям, представленным формулой (II); DSPC относится ко всем соединениям, представленным формулой (III).



Формула (I)



Формула (II)

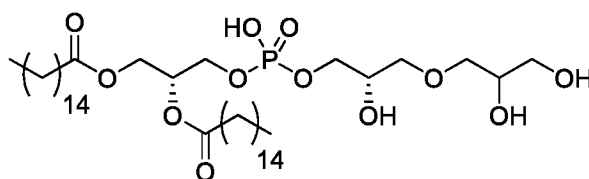


Формула (III)

Если явно не указано иное, структура или формула Льюиса, тривиальное название или систематическое название, молекулы предназначены для охвата всех таутомеров, т. е.

структурных изомеров, которые легко взаимопревращаются, и стереоизомеров этих молекул в контексте настоящей заявки. Например, формула (I) содержит три хиральных углеродных центра. Стереоконфигурация одного из этих хиральных углеродных центров была точно определена и должна быть интерпретирована как таковая. Стереоконфигурация других двух хиральных углеродных центров не была установлена. Таким образом, все эписмеры в отношении этих двух хиральных углеродных центров описаны формулой (I). Также следует отметить, что структура или формула Льюиса, тривиальное название или систематическое название молекулы предназначены охватывать все состояния протонирования и соли, если явно не указано иное. Например, формула (I) также описывает DPPG₂, где один из атомов кислорода, ковалентно прикрепленных к фосфору, заряжен отрицательно.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV):



Формула (IV).

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂) имеют общую концентрацию по меньшей мере 50 мол. %, по меньшей мере 60 мол. %, по меньшей мере 70 мол. %, по меньшей мере 80 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 91 мол. %, по меньшей мере 92 мол. %, по меньшей мере 93 мол. %, по меньшей мере 94 мол. %, по меньшей мере 95 мол. %, по меньшей мере 96 мол. %, по меньшей мере 97 мол. %, по меньшей мере 98 мол. %, или по меньшей мере 99 мол. %, или по меньшей мере 99,5 мол. %, или по меньшей мере 99,6 мол. %, или по меньшей мере 99,7 мол. %, или по меньшей мере 99,8 мол. %, или по меньшей мере 99,9 мол. % в указанном бислое. В контексте данного варианта осуществления понятно, что не все липиды, упомянутые выше, могут, но не должны содержаться в указанной термочувствительной липосоме.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой состоит из 1,2-

дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (DSPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерина (DPPG₂).

Чистота термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению представляет собой общую концентрацию 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (DSPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению с чистотой по меньшей мере 50 мол. %, по меньшей мере 60 мол. %, по меньшей мере 70 мол. %, по меньшей мере 80 мол. %, по меньшей мере 90 мол. %, по меньшей мере 91 мол. %, по меньшей мере 92 мол. %, по меньшей мере 93 мол. %, по меньшей мере 94 мол. %, по меньшей мере 95 мол. %, по меньшей мере 96 мол. %, по меньшей мере 97 мол. %, по меньшей мере 98 мол. %, или по меньшей мере 99 мол. %, или по меньшей мере 99,5 мол. %, или по меньшей мере 99,6 мол. %, или по меньшей мере 99,7 мол. %, или по меньшей мере 99,8 мол. %, или по меньшей мере 99,9 мол. %, или 100 мол. %.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин (DPPG₂) в совокупности составляют по меньшей мере 95% от числа молекул, содержащихся в указанном бислое, и

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и/или
- где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина, производного доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана, производного иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина, производного гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, и где указанный активный фармацевтический ингредиент содержится во внутрилипосомальном буфере, более предпочтительно
 - где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09,

- 5 ○ где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20,
- 10 ○ где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15, и/или
- 10 - где указанный внутрелипосомальный буфер характеризуется рН от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или
- где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

15 Очевидно, что, если в мол. % приведена общая концентрация группы липидов в бислое, то указанный бислой может, но не должен, содержать все типы липидов из указанной группы липидов. Например, бислой, где концентрация каждого из DPPC и DSPC составляет 45 мол. %, может быть описан как бислой, где общая концентрация DPPC, DSPC и DPPG₂ составляет по меньшей мере 90 мол. %.

20 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55; и/или где молярная концентрация 1,2-

25 дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25; и/или где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35.

30 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55; и/или где молярная концентрация 1,2-

дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до 0,25; и где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35, предпочтительно

- 5 - где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и/или
- 10 - где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина, производного доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана, производного иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина, производного гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, где более предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли, и где указанный активный фармацевтический ингредиент содержится во внутрилипосомальном буфере, более предпочтительно
- 15 ○ где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09,
- 20 ○ где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20,
- 25 ○ где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15, и/или
- 30 - где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- где указанный бислой не содержит холестерина или его производное; и/или
- где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

DPPC является основным компонентом в термочувствительной липосоме согласно предпочтительному варианту осуществления выше, поскольку его температура перехода (41,4°C) немного выше температуры тела. Нежелательную утечку лекарственного средства при температуре тела, определенной ниже, можно уменьшить путем смешивания DPPC с
5 небольшими количествами DSPC, который характеризуется температурой перехода 54,9°C.

Лизолипид представляет собой амфифильную молекулу, которая является продуктом гидролиза липида. Например, 1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин, получаемый в результате гидролиза по 2-сложноэфирной связи в DPPC, представляет собой лизолипид. Предпочтительно лизолипид представляет собой моноацил-sn-глицеро-3-
10 фосфатидилхолин, моноацил-sn-глицеро-3-фосфатидилглицерин или моноацил-sn-глицеро-3-фосфатидилдиглицерин.

Без ограничения этой теорией лизолипиды влияют на температуру перехода бислоя, содержащегося в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, тем самым воздействуя на индуцируемое теплом высвобождение активного фармацевтического
15 ингредиента, содержащегося в указанной термочувствительной липосоме. Это было показано на примере термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению в примере 5. Таким образом, в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению предпочтительна низкая концентрация лизолипидов, предпочтительно менее чем 5 мол. %, менее чем 4 мол. %, менее чем 3 мол. %, менее чем 2 мол. %, менее чем
20 1 мол. %, менее чем 1 мол. %, менее чем 0,9 мол. %, менее чем 0,8 мол. %, менее чем 0,7 мол. %, менее чем 0,6 мол. %, менее чем 0,5 мол. %, менее чем 0,4 мол. %, менее чем 0,3 мол. %, менее чем 0,2 мол. % или менее чем 0,1 мол. %.

Фосфолипиды DPPG_n, такие как DPPG₂, являются более склонными к разложению, чем стандартные фосфолипиды, такие как DPPC и DSPC. Это увеличивает проблему
25 стабилизации термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению и композиции согласно настоящему изобретению по сравнению с другими составами, такими как, например, LTSL. Стабильность термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению и композиции согласно настоящему изобретению обсуждается ниже. Следует также добавить, что активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в указанной
30 термочувствительной липосоме или композиции, может способствовать образованию лизолипидов или индуцировать его.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где концентрация лизолипидов, содержащихся в бислое, содержащемся в указанной термочувствительной липосоме,

составляет менее чем 5 мол. %, менее чем 4 мол. %, менее чем 3 мол. %, менее чем 2 мол. %, менее чем 1 мол. %, менее чем 1 мол. %, менее чем 0,9 мол. %, менее чем 0,8 мол. %, менее чем 0,7 мол. %, менее чем 0,6 мол. %, менее чем 0,5 мол. %, менее чем 0,4 мол. %, менее чем 0,3 мол. %, менее чем 0,2 мол. % или менее чем 0,1 мол. %.

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где концентрация лизолипидов, содержащихся в бислое, содержащемся в указанной термочувствительной липосоме, составляет менее чем 2 мол. %, предпочтительно менее чем 1 мол. %, и

- 10 - где 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPPC), 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DSPC) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилглицерин (DPPG₂) в сочетании составляют по меньшей мере 95% от числа молекул, содержащихся в указанном бислое; и/или
- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и/или
- 15 - где указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина, производного доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, иринотекана, производного иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли и гемцитабина, производного гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли, где более
- 20 предпочтительно указанный активный фармацевтический ингредиент выбран из группы, состоящей из доксорубина или его фармацевтически приемлемой соли, гемцитабина или его фармацевтически приемлемой соли и иринотекана или его фармацевтически приемлемой соли, и где указанный активный фармацевтический ингредиент содержится во внутрилипосомальном буфере,
- 25 более предпочтительно
 - где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09,
 - 30 ○ где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20,

- где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15, и/или

- 5 - где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и/или
- где указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и/или
- где указанный 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

10 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где бислой, содержащийся в указанной термочувствительной липосоме, не содержит холестерин. В контексте настоящей заявки бислой, который не содержит холестерин, означает бислой, который не содержит определяемое количество холестерина или его производного. В данном контексте

15 производное холестерина предпочтительно означает сложный эфир холестерина.

 Амфифильные молекулы, содержащиеся в бислое, содержащемся в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, имеют склонность к образованию ламеллярных или мицеллярных структур. Амфифильная молекула со склонностью к образованию мицеллярных структур термодинамически способствует

20 образованию мицелл или мицеллярных структур в суспензии. Амфифильная молекула со склонностью к образованию ламеллярных структур термодинамически способствует образованию ламеллярных структур или липосом в суспензии. В контексте настоящей заявки амфифильная молекула с высокой склонностью к образованию мицеллярных структур называется поверхностно-активным веществом. Например, большинство

25 липолипидов и DSPE-PEG₂₀₀₀ рассматриваются как поверхностно-активные вещества в контексте настоящей заявки.

 Без ограничения данной теорией, поскольку термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению является ламеллярной структурой, образование указанной термочувствительной липосомы является термодинамически неблагоприятным, т. е.

30 указанная термочувствительная липосома дестабилизируется за счет высокой концентрации поверхностно-активных веществ.

 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где концентрация поверхностно-активных веществ составляет менее чем 5 мол. %, менее чем 4 мол. %, менее чем 3 мол. %, менее чем

2 мол. %, менее чем 1 мол. %, менее чем 1 мол. %, менее чем 0,9 мол. %, менее чем 0,8 мол. %, менее чем 0,7 мол. %, менее чем 0,6 мол. %, менее чем 0,5 мол. %, менее чем 0,4 мол. %, менее чем 0,3 мол. %, менее чем 0,2 мол. % или менее чем 0,1 мол. %.

Предпочтительные термочувствительные липосомы

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09,

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и
- где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и
- где предпочтительно указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и
- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC),
 - 20 ○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и
 - 25 ○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и
- где предпочтительно указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

30 Предпочтительно термочувствительная липосома согласно вышеприведенному варианту осуществления содержится в подходящей системе доставки лекарственного средства, более предпочтительно предназначена для применения в лечении рака.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический

ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18,

5 предпочтительно по меньшей мере 0,20,

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и

- где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и

10 - где предпочтительно указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и

- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC),

- где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и

15

- где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и

20

- где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и

- где предпочтительно указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

25 Предпочтительно термочувствительная липосома согласно вышеприведенному варианту осуществления содержится в подходящей системе доставки лекарственного средства, более предпочтительно предназначена для применения в лечении рака.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное гемцитабина или его

30 фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15,

- где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и
- где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и
- 5 - где предпочтительно указанный бислой не содержит холестерин или его производное; и
- где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC),
 - 10 ○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и
 - где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25, и
 - где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не
 - 15 более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35; и
- где предпочтительно указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV).

Предпочтительно термочувствительная липосома согласно вышеприведенному варианту осуществления содержится в подходящей системе доставки лекарственного средства, более предпочтительно предназначена для применения в лечении рака.

Дополнительные термочувствительные липосомы

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает термочувствительную липосому, содержащую бислой и внутрилипосомальный буфер, где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет по меньшей мере 15 процентов, где указанная термочувствительная липосома содержит активный фармацевтический ингредиент, где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8. Такие термочувствительные липосомы упоминаются в данной заявке как дополнительные липосомы согласно или по настоящему изобретению или дополнительные термочувствительные липосомы согласно или по настоящему изобретению.

Все предпочтительные варианты осуществления и определения, описанные выше в контексте термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, применимы к дополнительным термочувствительным липосомам согласно настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, которая также является термочувствительной липосомой согласно настоящему изобретению.

5 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где молярное соотношение указанного активного фармацевтического ингредиента и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,05 до не более 0,3.

10 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубицин, производное доксорубидина или его фармацевтически приемлемую соль, где предпочтительно молярное соотношение указанного доксорубидина, указанного производного доксорубидина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, более предпочтительно от 0,07 до не более 0,09.

15 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, где предпочтительно молярное соотношение указанного иринотекана, указанного производного иринотекана или его 20 указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, более предпочтительно по меньшей мере 0,20.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное 25 гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, где предпочтительно молярное соотношение указанного гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, более предпочтительно по меньшей мере 0,15.

Получение липосом

30 Липосомы, содержащие активный фармацевтический ингредиент, такие как термочувствительные липосомы согласно настоящему изобретению или дополнительные термочувствительные липосомы согласно настоящему изобретению, можно получать с помощью широкого спектра различных методик, таких как гидратация липидной пленки,

введение этанола и метод экструзии, известных специалисту в данной области. В примере 1 описано получение термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно липосому можно получать способом, включающим:

- а) получение незагруженной липосомы, где указанная незагруженная липосома содержит бислой с таким же липидным составом, что и у указанной липосомы, и где указанная незагруженная липосома не содержит активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в указанной липосоме, или где концентрация указанного активного фармацевтического ингредиента во внутрилипосомальном буфере указанной незагруженной липосомы является низкой, как определено ниже;
- ас) предпочтительно экструдирование указанной незагруженной липосомы с получением однослойной липосомы и
- б) загрузку указанной незагруженной липосомы в буфер для загрузки.

При получении согласно вышеприведенному способу липосомы, содержащей активный фармацевтический ингредиент во внутрилипосомальном буфере, такой как термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, описанная в примере 1, сначала получают соответствующую незагруженную липосому, не содержащую указанный активный фармацевтический ингредиент в указанном внутрилипосомальном буфере или содержащую его низкую концентрацию (незагруженная липосома). Затем концентрацию указанного активного фармацевтического ингредиента в указанном внутрилипосомальном буфере повышают в ходе загрузки. Низкая концентрация предпочтительно означает концентрацию, которая в менее чем 0,1 раза, или в менее чем 0,01 раза, или в менее чем 0,001 раза, или в менее чем 0,0001 раза ниже концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента во внутрилипосомальном буфере конечной липосомы. Отсутствие активного фармацевтического ингредиента предпочтительно означает отсутствие определяемого количества указанного активного фармацевтического ингредиента. В данном документе концентрацию указанного активного фармацевтического ингредиента можно определять посредством высокоэффективной жидкофазной хроматографии (ВЭЖХ), как показано в примере 7.

Загрузка, проводимая на стадии b) в вышеприведенном способе, представляет собой перенос активного фармацевтического ингредиента из внелипосомального буфера во внутрилипосомальный буфер, при этом указанный активный фармацевтический ингредиент проходит через бислой. В этом смысле загрузка (активного фармацевтического ингредиента) может предусматриваться как процесс, обратный высвобождению (активного

фармацевтического ингредиента). Внелипосомальный буфер в ходе загрузки также называется буфером для загрузки в контексте настоящей заявки.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения липосомы, содержащей активный фармацевтический ингредиент, где способ включает стадии а) и b), описанные выше, и где указанный буфер для загрузки характеризуется концентрацией соли, составляющей по меньшей мере 66 мМ, и осмолярностью, составляющей по меньшей мере 250 мОсмоль/кг. Более предпочтительно указанный буфер для загрузки характеризуется концентрацией соли, составляющей по меньшей мере 66 мМ, и осмолярностью, составляющей от 250 мОсмоль/кг до не более 350 мОсмоль/кг. Предпочтительно указанная липосома в указанном предпочтительном способе представляет собой термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению или дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению.

В примере 6 показано, что термочувствительные липосомы согласно настоящему изобретению можно получать посредством предпочтительного способа, описанного выше, используя буфер для загрузки с концентрацией соли, составляющей 66 мМ, и осмолярностью, составляющей 294 мОсмоль/кг или 300 мОсмоль/кг. В частности, в примере 6 было показано, что буферы для загрузки с высокими значениями концентрации соли и осмолярности приводят к более кратковременной загрузке (20 минут для буфера А с осмолярностью 300 мОсмоль/кг без трегалозы, 90 минут для буфера С с осмолярностью 294 мОсмоль/кг и 8,9% (вес/об.) трегалозы).

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения липосомы, содержащей активный фармацевтический ингредиент, при этом способ включает стадии а) и b), как описано выше, где указанный способ включает замену буфера, где указанный способ включает применение буфера для загрузки и применение буфера для хранения, и где указанный буфер для хранения характеризуется концентрацией соли, составляющей менее чем 100 мМ, и осмолярностью, составляющей более чем 300 мОсмоль/кг. Более предпочтительно указанный буфер для хранения характеризуется концентрацией соли, составляющей менее чем 100 мМ, и осмолярностью, составляющей от 300 мОсмоль/кг до не более 450 мОсмоль/кг.

Водный раствор, контактирующий с бислоем, содержащимся в липосоме согласно настоящему изобретению, представляет собой внелипосомальный буфер. В контексте (фармацевтических) композиций указанный внелипосомальный буфер называется буфером для хранения, если указанная термочувствительная липосома диспергирована в указанном внелипосомальном буфере.

В примере 9 показано, что способ, в котором применяется замена буфера на буфер для хранения с низкой концентрацией соли, приводит к более низкой утечке содержащегося в нем активного фармацевтического ингредиента и к более высокой стабильности дисперсии.

5 Способ согласно вышеприведенным аспектам настоящего изобретения называется способом согласно настоящему изобретению в контексте данной заявки. Следует отметить, что определения и варианты осуществления, представленные выше в контексте термочувствительных липосом, могут применяться с соответствующими поправками к липосомам в целом, как упомянуто в контексте способа согласно настоящему изобретению. Например, диаметр термочувствительной липосомы четко определяется таким же образом,
10 что и диаметр липосомы, для которой описан в данном документе способ получения.

 Специалисту в данной области понятно, что композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению можно также получать посредством способа согласно настоящему изобретению или посредством способа, предусматривающего способ согласно настоящему изобретению.

15 Любые предпочтение или вариант осуществления, касающиеся термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению или композиции, содержащей термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, могут быть объединены со способом согласно настоящему изобретению, при этом подразумевается, что эти предпочтения и варианты осуществления также раскрывают соответствующие
20 способы согласно настоящему изобретению для получения таких термочувствительных липосом или композиций.

 Из контекста способа согласно настоящему изобретению понятно, что концентрация, касающаяся липидов, содержащихся в бислое, может относиться либо к липидам, содержащимся в бислое указанной незагруженной липосомы, либо к бислою указанной
25 липосомы, поскольку липидные составы этих бислов являются одинаковыми.

 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где буфер для загрузки характеризуется концентрацией соли, составляющей по меньшей мере 66 мМ, и осмолярностью, составляющей от 250 мОсмоль/кг до не более 350 мОсмоль/кг, и указанный буфер для хранения характеризуется
30 концентрацией соли, составляющей менее чем 100 мМ, и осмолярностью, составляющей более чем 300 мОсмоль/кг. Наиболее предпочтительно указанный буфер для загрузки характеризуется концентрацией соли, составляющей от 66 мМ до не более 120 мМ, и осмолярностью, составляющей от 250 мОсмоль/кг до не более 350 мОсмоль/кг, и указанный

буфер для хранения характеризуется концентрацией соли, составляющей менее чем 100 mM, и осмолярностью, составляющей от 390 мОсмоль/кг.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где указанная липосома содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂), где предпочтительно молярная концентрация DPPG₂ в бислое указанной липосомы составляет от 0,10 до не более 0,95, от 0,10 до не более 0,90, от 0,10 до не более 0,85, от 0,10 до не более 0,80, от 0,10 до не более 0,75, от 0,10 до не более 0,70, от 0,10 до не более 0,65, от 0,10 до не более 0,60, от 0,10 до не более 0,55, от 0,10 до не более 0,50, от 0,10 до не более 0,45, от 0,10 до не более 0,40, от 0,15 до не более 0,35 или от 0,20 до не более 0,30.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где указанная липосома представляет собой термочувствительную липосому. В еще более предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где указанная липосома представляет собой термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению или дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению. В наиболее предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где указанная липосома представляет собой термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое, содержащемся в указанной незагруженной липосоме, составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55; и/или где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое, содержащемся в указанной незагруженной липосоме, составляет от 0,15 до не более 0,25; и/или где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое, содержащемся в указанной незагруженной липосоме, составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где указанная незагруженная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 200 нанометров, предпочтительно от 100 нанометров до не более 150 нанометров.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению,

где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09; или

где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20; или

где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, и где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15.

Предпочтительно способ согласно настоящему изобретению не включает добавление холестерина или его производного.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где стадия а), включенная в указанный способ, включает:

- aa) получение раствора липидов в органическом растворителе с таким же молярным соотношением, что и липидов в бислое указанной липосомы; и
- ab) смешивание указанного раствора липидов с водным раствором,

где указанный водный раствор характеризуется по сути такой же композицией, что и внутрилипосомальный буфер, содержащийся в указанной липосоме, при отсутствии указанного активного фармацевтического ингредиента, где предпочтительно указанный водный раствор характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8, и

где указанное смешивание предпочтительно проводят посредством введения органического растворителя, и

где указанное смешивание приводит к образованию незагруженной липосомы; и

- 5 ас) предпочтительно экструдирование указанной незагруженной липосомы с получением однослойной липосомы.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно настоящему изобретению, где стадия а), включенная в указанный способ, включает стадии 10 аа), аб) и ас), определенные выше, и где указанный органический растворитель, используемый на стадии аа), выбран из группы органических растворителей, способных растворять липиды, где предпочтительно указанный органический растворитель выбран из группы, состоящей из смеси хлороформ/метанол 9:1 (об./об.), хлороформа, метанола, изопропанола, этанола и их смесей.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно 15 настоящему изобретению, где стадия а), включенная в указанный способ, включает стадии аа), аб) и ас), определенные выше, и где указанный водный раствор, используемый на стадии аб), содержит буфер, выбранный из группы, состоящей из буфера на основе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, буфера на основе $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, фосфатного буфера и буфера на основе HBS.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно 20 настоящему изобретению, где стадия а), включенная в указанный способ, включает стадии аа), аб) и ас), определенные выше, и где указанное экструдирование проводят при значениях температуры, при которых липиды находятся в жидкофазном состоянии.

Указанная загрузка незагруженной липосомы на стадии б) способа согласно настоящему изобретению приводит к переносу указанного активного фармацевтического ингредиента 25 во внутрилипосомальный буфер и описана более подробно ниже.

Предпочтительно указанную загрузку осуществляют при температуре от 35°C до 39°C, более предпочтительно от 36°C до 38°C, наиболее предпочтительно от 37°C до 38°C.

Способ согласно настоящему изобретению предпочтительно дополнительно включает стадии фильтрования.

30 Предпочтительный вышеприведенный способ получения приведен в качестве примера на фиг. 2, где на стадии (аб) применяют введение этанола. Следует отметить, что на фиг. 2 отмечено две замены буфера. Первая предусматривает замену внелипосомального буфера в конце стадии (аб) буфером для загрузки. Вторая предусматривает замену буфера для загрузки буфером для хранения.

Предпочтительно способ согласно настоящему изобретению включает замену буфера. Замена буфера определяется как полная или частичная замена внелипосомального буфера новым внелипосомальным буфером. В данном случае следует понимать, что замена может предусматривать регуляцию концентрации компонента в указанном буфере, добавление компонента в указанный буфер и/или удаление компонента из указанного буфера. Предпочтительный способ замены буфера выбран из группы, состоящей из проточной фильтрации вдоль потока (TFF), хроматографии и центрифугирования, предпочтительно проточной фильтрации вдоль потока.

Пассивная загрузка представляет собой загрузку под воздействием градиента концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента через указанный бислой. Что касается термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, то при температуре выше температуры перехода указанной термочувствительной липосомы высокое соотношение концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента во внелипосомальном буфере и концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента во внутрилипосомальном буфере приводит к переносу через указанный бислой, который находится в жидкой фазе. Высокое соотношение предпочтительно означает по меньшей мере 10, или по меньшей мере 100, или по меньшей мере 1000, или по меньшей мере 10000. Предпочтительно в начале пассивной загрузки определяемое количество указанного активного фармацевтического ингредиента в указанном внутрилипосомальном буфере отсутствует. В данном случае концентрация указанного активного фармацевтического ингредиента определяется посредством ВЭЖХ. После переноса требуемого количества активного фармацевтического ингредиента во внутрилипосомальный буфер температура понижается, и указанный бислой обратно переходит в гелевую фазу. Поскольку в гелевой фазе проницаемость бислоя ниже, активный фармацевтический ингредиент внутрилипосомального буфера не будет легко переходить во внелипосомальный буфер, даже если концентрация активного фармацевтического ингредиента во внелипосомальном буфере понизится.

Активная загрузка представляет собой загрузку под воздействием градиента ионов в указанном бислое. Это может быть градиент аммония, градиент протонов (т. е. градиент pH) или градиент соли EDTA, например. Например, доксорубин, иринотекан и гемцитабин, все из которых являются растворимыми в воде активными фармацевтическими ингредиентами, могут переноситься во внутрилипосомальный буфер в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению посредством активной загрузки. Это подробно описано в примере 1.

Предпочтительно способ согласно настоящему изобретению включает d) хранение указанной загруженной липосомы в буфере для хранения от 1 до не более 5 недель при температуре приблизительно 5°C, от 1 до не более 10 недель при температуре приблизительно 5°C, от 1 до не более 15 недель при температуре приблизительно 5°C, от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C, или от 12 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C. Более предпочтительно указанная загруженная липосома стабильна при указанном хранении, как определено ниже.

Предпочтительно способ согласно настоящему изобретению включает добавление по меньшей мере одного вспомогательного вещества, которое может дополнительно способствовать улучшению доставки указанной липосомы и/или композиции, содержащей указанную композицию, к ткани и/или клетке и/или в ткань и/или клетку.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ получения липосомы, предпочтительно термочувствительной липосомы, более предпочтительно термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению или дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, наиболее предпочтительно термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, включающий:

a) получение незагруженной липосомы, где указанная незагруженная липосома содержит бислой с таким же липидным составом, что и у указанной липосомы и где указанная незагруженная липосома не содержит активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в указанной липосоме, при этом указанное a) получение указанной незагруженной липосомы включает:

aa) получение раствора липидов в органическом растворителе с таким же молярным соотношением, что и липидов в бислое указанной липосомы, при этом предпочтительно указанный органический растворитель представляет собой смесь хлороформ/метанол 9:1 (об./об.), хлороформ или этанол; и

ab) смешивание указанного раствора липидов с водным раствором, где указанный водный раствор характеризуется по сути такой же композицией, что и внутрилипосомальный буфер, содержащийся в указанной липосоме, при отсутствии указанного активного фармацевтического ингредиента, где предпочтительно указанный

водный раствор характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8, и

где предпочтительно указанный водный раствор содержит буфер, выбранный из группы, состоящей из буфера на основе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, буфера на основе $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, фосфатного буфера и буфера на основе HBS, и

где указанное смешивание предпочтительно проводят посредством введения органического растворителя, и

где указанное смешивание приводит к образованию незагруженной липосомы; и

ас) предпочтительно экструдирование указанной незагруженной липосомы,

b) обеспечение загрузки указанной незагруженной липосомы активным фармацевтическим ингредиентом путем активной загрузки с использованием буфера для загрузки с образованием загруженной липосомы, где указанный буфер для загрузки характеризуется концентрацией соли, составляющей от 66 мМ до не более 120 мМ, и осмолярностью, составляющей от 250 мОсмоль/кг до не более 350 мОсмоль/кг, где указанную загрузку предпочтительно осуществляют при температуре от 35°C до 39°C, более предпочтительно от 36°C до 38°C, наиболее предпочтительно от 37°C до 38°C;

с) замену указанного буфера для загрузки буфером для хранения, при этом указанный буфер для хранения характеризуется концентрацией соли, составляющей менее чем 100 мМ, и осмолярностью, составляющей более чем 300 мОсмоль/кг,

d) предпочтительно хранение указанной загруженной липосомы в указанном буфере для хранения от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C, или от 12 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно предыдущему варианту осуществления, где липосома, полученная в конце стадии с), является стабильной при указанном хранении на стадии d), при этом стабильность при хранении или хранение определяются ниже.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрен способ согласно предыдущему варианту осуществления, где предпочтительно указанное хранение на стадии

d) составляет от 12 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C , где липосома, полученная в конце стадии с), является стабильной при хранении, где стабильность при хранении означает следующее:

- концентрация активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной липосоме, полученной в конце стадии с), не изменяется более чем на 15% при хранении; и/или
- диаметр указанной липосомы, полученной в конце стадии с), не изменяется более чем на 30% при хранении; и/или
- концентрация в бислое лизолипидов, содержащихся в указанной липосоме, полученной в конце стадии с), не увеличивается более чем на 5% при хранении; и/или
- полидисперсность указанной термочувствительной липосомы или полидисперсность указанной липосомы, полученной в конце стадии с), не увеличивается свыше 0,5 при хранении; и/или
- если указанная липосома, полученная в конце стадии с), характеризуется высокоселективной доставкой при тепловой обработке, то указанная липосома по-прежнему характеризуется высокоселективной доставкой при тепловой обработке после хранения; и/или
- если указанная липосома, полученная в конце стадии с), является подходящей системой доставки лекарственного средства, то указанная липосома по-прежнему является подходящей системой доставки лекарственного средства после хранения.

Композиция

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена композиция, содержащая термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, где предпочтительно указанная композиция содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество, которое может дополнительно способствовать улучшению нацеливания или доставки указанной композиции, или указанной термочувствительной липосомы, или указанного активного фармацевтического ингредиента к ткани или клетке или в ткань или клетку. Предпочтительная ткань или клетка представляет собой опухоль или опухолевую клетку. Композиции, описанные в данном документе, упоминаются в данном документе как композиции согласно или по настоящему изобретению. Композиция согласно настоящему изобретению может содержать одну или несколько термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего изобретения вспомогательное вещество может быть представлено отдельной молекулой, но также оно может быть представлено сопряженным фрагментом.

В предпочтительном варианте осуществления указанная композиция предназначена для применения в качестве лекарственного препарата, предпочтительно для применения в лечении, облегчении, задержке, излечении и/или предупреждении рака. Указанная композиция, таким образом, представляет собой фармацевтическую композицию.

5 Фармацевтическая композиция, как правило, содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. В предпочтительном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит термочувствительную липосому, как определено в данном документе, и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый состав, наполнитель, консервант, солюбилизатор, носитель, 10 разбавитель, вспомогательное вещество, соль, адъювант и/или растворитель. Такие фармацевтически приемлемые носитель, наполнитель, консервант, солюбилизатор, разбавитель, соль, адъювант, растворитель и/или вспомогательное вещество можно, например, найти в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

15 Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению может содержать по меньшей мере одну ионогенную группу. Ионогенная группа может быть основной или кислотной и может быть заряженной или нейтральной. Ионогенная группа может быть представлена в виде ионной пары с соответствующим противоионом, который несет противоположный(-ые) заряд(ы). Примерами катионных противоионов являются натрий, 20 калий, цезий, трис, литий, кальций, магний, триалкиламмоний, триэтиламмоний и тетраалкиламмоний. Примерами анионных противоионов являются хлорид, бромид, йодид, лактат, мезилат, безилат, трифлат, ацетат, трифторацетат, дихлорацетат, тартрат, лактат и цитрат.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать 25 вспомогательное средство для улучшения стабильности, растворимости, абсорбции, биодоступности, активности, фармакокинетики, фармакодинамики, клеточного поглощения и внутриклеточного трафика указанного активного фармацевтического ингредиента.

Композиция согласно настоящему изобретению может вводиться в эффективной 30 концентрации, установленное количество раз животному, предпочтительно млекопитающему. Введение может происходить местным, системным и/или парентеральным путями, например, внутривенным, подкожным, внутрибрюшинным, интратекальным, внутримышечным, внутриглазным, назальным, урогенитальным,

внутрикожным, кожным, энтеральным, интравитреальным, интракавернозным, внутрицеребральным, интратекальным, эпидуральным или пероральным путем.

Соединения, которые содержатся в композиции согласно настоящему изобретению, также могут быть предусмотрены по отдельности, например, для обеспечения последовательного введения активных компонентов композиции согласно настоящему изобретению. В таком случае композиция согласно настоящему изобретению представляет собой комбинацию соединений, содержащую по меньшей мере термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

Как определено выше, водный раствор, контактирующий с бислоем, содержащимся в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, представляет собой внелипосомальный буфер. В контексте (фармацевтических) композиций указанный внелипосомальный буфер называется буфером для хранения, если указанная термочувствительная липосома диспергирована в указанном внелипосомальном буфере.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению, содержащая буфер для хранения, где указанный буфер для хранения характеризуется концентрацией соли менее чем 120 mM, или менее чем 110 mM, или менее чем 100 mM, или менее чем 90 mM, или менее чем 80 mM, или менее чем 70 mM, или менее чем 60 mM, или менее чем 50 mM, или менее чем 40 mM, или менее чем 30 mM, или менее чем 20 mM, или менее чем 10 mM.

В примере 9 показано, что композиция согласно настоящему изобретению, характеризующаяся низкой концентрацией соли, приводит к более низкой утечке активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в ней, и более высокой стабильности дисперсии.

В другом предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению, содержащая буфер для хранения, где осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 150 мОсмоль/кг, или более чем 200 мОсмоль/кг, или более чем 250 мОсмоль/кг, или более чем 300 мОсмоль/кг, или более чем 350 мОсмоль/кг, или более чем 400 мОсмоль/кг. Предпочтительно осмолярность указанного буфера для хранения составляет менее чем 450 мОсмоль/кг, более предпочтительно менее чем 410 мОсмоль/кг. В наиболее предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению, содержащая буфер для хранения, где осмолярность указанного буфера для хранения составляет от 200 мОсмоль/кг до не более 450 мОсмоль/кг, или где осмолярность

указанного буфера для хранения составляет от 300 мОсмоль/кг до не более 450 мОсмоль/кг, или где осмолярность указанного буфера для хранения составляет от 200 мОсмоль/кг до не более 410 мОсмоль/кг, или где осмолярность указанного буфера для хранения составляет от 300 мОсмоль/кг до не более 410 мОсмоль/кг.

5 В другом предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению, содержащая буфер для хранения, где указанный буфер для хранения содержит криопротектор. Предпочтительно указанный криопротектор представляет собой трегалозу или сахарозу. Наиболее предпочтительно указанный криопротектор представляет собой трегалозу.

10 Включение криопротектора в композицию согласно настоящему изобретению обеспечивает хранение указанной композиции при низкой температуре для предотвращения разложения активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в термочувствительной липосоме, содержащейся в указанной композиции. В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно
15 настоящему изобретению, при этом указанная композиция по-прежнему представляет собой подходящую систему доставки лекарственного средства, как определено выше, после хранения при температуре ниже 0°C, или ниже -5°C, или ниже -10°C, или ниже -15°C, или ниже -20°C в течение по меньшей мере 30 дней.

В примере 9 показано, что композиция согласно настоящему изобретению,
20 характеризующаяся высокой осмолярностью и наличием трегалозы в качестве криопротектора, способна предотвращать разложение активного фармацевтического ингредиента.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению, где термочувствительная липосома, содержащаяся в указанной
25 композиции, диспергирована в буфере для хранения, при этом концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и/или осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг. Предпочтительно композиция согласно этому варианту осуществления содержит криопротектор.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно
30 настоящему изобретению, содержащая множество термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, диспергированных в буфере для хранения, при этом концентрация указанных термочувствительных липосом в указанном буфере для хранения оставляет от 10 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, или от 15 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, или от 20 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, или от 25 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, или

от 30 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, или от 35 ммоль/л до не более 45 ммоль/л, или от 37,5 ммоль/л до не более 42,5 ммоль/л. Предпочтительно концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и/или осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг.

5 В другом предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению, где концентрация термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению составляет от 35 ммоль/л до не более 45 ммоль/л, где индекс полидисперсности (PDI) указанных термочувствительных липосом составляет менее чем 0,5, или менее чем 0,4, или менее чем 0,3, или менее чем 0,2, или менее чем 0,1,
10 или менее чем 0,09, или менее чем 0,08, или менее чем 0,07, или менее чем 0,06, или менее чем 0,05. Предпочтительно концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и/или осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг.

В другом предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция
15 согласно настоящему изобретению, где диаметр термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, содержащихся в указанной композиции, составляет от 100 нм до не более 150 нм, где индекс полидисперсности (PDI) указанных термочувствительных липосом составляет менее чем 0,5, или менее чем 0,4, или менее чем 0,3, или менее чем 0,2, или менее чем 0,1, или менее чем 0,09, или менее чем 0,08, или менее чем 0,07, или менее
20 чем 0,06, или менее чем 0,05; где более предпочтительно полидисперсность указанных термочувствительных липосом составляет менее чем 0,1. Предпочтительно концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и/или осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно
25 настоящему изобретению, содержащая буфер для хранения, где соотношение концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента в указанном буфере для хранения и концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента во внутрилипосомальном буфере, содержащемся в термочувствительных липосомах, содержащихся в указанной композиции, составляет менее чем 0,1, или менее чем 0,09, или
30 менее чем 0,08, или менее чем 0,07, или менее чем 0,06, или менее чем 0,05, или менее чем 0,04, или менее чем 0,03, или менее чем 0,02, или менее чем 0,01, или менее чем 0,009, или менее чем 0,008, или менее чем 0,007, или менее чем 0,006, или менее чем 0,005, или менее чем 0,004, или менее чем 0,003, или менее чем 0,002, или менее чем 0,001.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению,

- 5 - где концентрация термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению составляет от 10 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, предпочтительно от 35 ммоль/л до не более 45 ммоль/л; и
- 10 - где указанная композиция содержит буфер для хранения, при этом концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг; и
- 15 - где активные фармацевтические ингредиенты, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, представляют собой доксорубицин, производное доксорубицина или его фармацевтически приемлемую соль, и при этом молярное соотношение доксорубицина, указанного производного доксорубицина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в бислоях, содержащихся в указанных термочувствительных липосомах, составляет от 0,06 до не более 0,10, предпочтительно от 0,07 до не более 0,09; и
- 20 - где указанные термочувствительные липосомы характеризуются диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и
- 20 - где внутрилипосомальные буферы, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, характеризуются pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и
- 25 - где предпочтительно бислои, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, не содержат холестерин или его производное; и
- 25 - где бислои, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, содержат 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC),
 - 30 ○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанных бислоях составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и
 - 30 ○ где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанных бислоях составляет от 0,15 до не более 0,25, и

- где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанных бислоях составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция
5 согласно вышеприведенному предпочтительному варианту осуществления, где индекс полидисперсности (PDI) указанных термочувствительных липосом составляет менее чем 0,5, или менее чем 0,4, или менее чем 0,3, или менее чем 0,2, или менее чем 0,1, или менее чем 0,09, или менее чем 0,08, или менее чем 0,07, или менее чем 0,06, или менее чем 0,05.

В примере 10 показано, что композиция согласно вышеприведенному варианту
10 осуществления представляет собой подходящую систему доставки лекарственного средства.

В частности, такая композиция представлена как стабильная при хранении в течение
длительного периода времени (16 месяцев), причем при хранении при $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, с
незначительными утечкой доксорубина и изменением диаметра термочувствительной
15 липосомы. Результаты дополнительно указывают на то, что композиция была стабильна в
течение 11 недель при хранении при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Никаких признаков разложения
фосфолипидов не наблюдалось в течение 12 месяцев хранения. Кроме того, композиция
была стабильна в течение шести циклов замораживания и оттаивания. Более того,
накопление доксорубина в опухолях было продемонстрировано *in vivo* посредством
20 исследования биораспределения на крысах Brown Norway с подкожным введением клеток
саркомы BN175 в заднюю конечность. Животные, обработанные с помощью композиции,
демонстрировали концентрацию доксорубина в нагретой опухоли в 15,8 раза выше, чем
концентрация в ненагретой ткани. Обработка крыс с помощью композиции показала
значительно улучшенную задержку роста опухоли по сравнению с животными,
25 обработанными солевым раствором (фиг. 13). Более того, по сравнению с нелипосомальной
обработкой доксорубином в эквивалентной дозе композиция также приводила к
значительной задержке роста опухоли и увеличению продолжительности жизни (фиг. 13).

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно
настоящему изобретению,

- 30 - где концентрация термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению составляет от 10 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, предпочтительно от 35 ммоль/л до не более 45 ммоль/л; и
- где указанная композиция содержит буфер для хранения, при этом концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и

осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг; и

- где активные фармацевтические ингредиенты, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, представляют собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, и при этом молярное соотношение иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в бислоях, содержащихся в указанных термочувствительных липосомах, составляет по меньшей мере 0,18, предпочтительно по меньшей мере 0,20; и

- где указанные термочувствительные липосомы характеризуются диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и

- где внутрилипосомальные буферы, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, характеризуются pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и

- где предпочтительно бислои, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, не содержат холестерина или его производное; и

- где бислои, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, содержат 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC),

○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанных бислоях составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и

○ где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанных бислоях составляет от 0,15 до не более 0,25, и

○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанных бислоях составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно вышеприведенному предпочтительному варианту осуществления, где индекс полидисперсности (PDI) указанных термочувствительных липосом составляет менее чем 0,5, или менее чем 0,4, или менее чем 0,3, или менее чем 0,2, или менее чем 0,1, или менее чем 0,09, или менее чем 0,08, или менее чем 0,07, или менее чем 0,06, или менее чем 0,05.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно настоящему изобретению,

- где концентрация термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению составляет от 10 ммоль/л до не более 50 ммоль/л, предпочтительно от 35 ммоль/л до не более 45 ммоль/л; и
- 5 - где указанная композиция содержит буфер для хранения, при этом концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг; и
- 10 - где активные фармацевтические ингредиенты, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, представляют собой гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, и при этом молярное соотношение гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в бислоях, содержащихся в указанных термочувствительных липосомах, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15; и
- 15 - где указанные термочувствительные липосомы характеризуются диаметром от 100 нанометров до не более 150 нанометров; и
- где внутрилипосомальные буферы, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, характеризуются рН от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8; и
- 20 - где предпочтительно бислои, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, не содержат холестерин или его производное; и
- где бислои, содержащиеся в указанных термочувствительных липосомах, содержат 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC),
- 25 ○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанных бислоях составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55, и
- где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанных бислоях составляет от 0,15 до не более 0,25, и
- 30 ○ где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанных бислоях составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена композиция согласно вышеприведенному предпочтительному варианту осуществления, где индекс

полидисперсности (PDI) указанных термочувствительных липосом составляет менее чем 0,5, или менее чем 0,4, или менее чем 0,3, или менее чем 0,2, или менее чем 0,1, или менее чем 0,09, или менее чем 0,08, или менее чем 0,07, или менее чем 0,06, или менее чем 0,05.

Дополнительная композиция

5 Настоящее изобретение дополнительно предусматривает композицию, содержащую термочувствительную липосому, диспергированную в буфере для хранения, где концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсморь/кг; где указанная термочувствительная липосома содержит бислой и внутрилипосомальный
10 буфер; где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет по меньшей мере 15 процентов; и где указанная термочувствительная липосома содержит активный фармацевтический ингредиент. Такие композиции упоминаются в настоящей заявке как дополнительные композиции согласно или по настоящему изобретению.

15 Все предпочтительные варианты осуществления и определения, описанные выше в контексте композиций согласно настоящему изобретению или термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, применимы к дополнительным композициям согласно настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная
20 композиция согласно настоящему изобретению, которая также представляет собой композицию согласно настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется рН от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8.

25 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанная дополнительная композиция содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество, которое может дополнительно способствовать улучшению доставки указанной композиции и/или указанной термочувствительной липосомы к ткани и/или клетке и/или в ткань и/или клетку.

30 В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль, при этом предпочтительно молярное соотношение указанного доксорубина, указанного производного

доксорубицина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, более предпочтительно от 0,07 до не более 0,09.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, при этом предпочтительно молярное соотношение указанного иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, более предпочтительно по меньшей мере 0,20.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, при этом предпочтительно молярное соотношение указанного гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, более предпочтительно по меньшей мере 0,15.

Система доставки лекарственного средства

Система доставки лекарственного средства представляет собой композицию, содержащую активный фармацевтический ингредиент, где другие соединения, содержащиеся в указанной композиции, способствуют улучшению стабильности, растворимости, абсорбции, биодоступности, активности, фармакокинетики, фармакодинамики, клеточного поглощения и/или внутриклеточного трафика указанного активного фармацевтического ингредиента. Предпочтительно термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению представляет собой систему доставки лекарственного средства.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома, указанная дополнительная термочувствительная

липосома, указанная композиция или указанная дополнительная композиция обладает одним или несколькими из следующих свойств, каждое из которых определено ниже:

- низкая активация комплемента,
- отсутствие анафилаксии,
- 5 - отсутствие токсичности,
- длительное время полураспада в кровотоке,
- отсутствие АВС,
- соответствующий клиренс,
- соответствующее биораспределение,
- 10 - высокоселективная доставка при тепловой обработке,
- высокая стабильность при хранении.

Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, характеризующаяся всеми вышеуказанными свойствами, является 15 подходящей для применения в качестве системы доставки лекарственного средства, как объяснено ниже, и упоминается подходящей системой доставки лекарственного средства в контексте настоящей заявки. В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена подходящая система доставки лекарственного средства.

20 Введение термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению животному может привести к таким побочным реакциям, как активация системы комплемента и анафилаксия.

25 Система комплемента является частью неадаптивной иммунной системы, как известно специалисту в данной области. Активация системы комплемента, в которой ключевую роль играют гранулоциты и главным образом нейтрофилы, может привести к обусловленной активацией комплемента псевдоаллергии (CARPA). Очевидно, что активация системы комплемента за счет введения системы доставки лекарственного средства является 30 нежелательной. Как поясняется в примере 2, активация комплемента, ассоциированная с термочувствительной липосомой согласно настоящему изобретению или композицией согласно настоящему изобретению, может определяться *in vitro* с помощью наборов для ELISA C3a, Bb и SC5b-9 на инкубированной с термочувствительной липосомой плазме крови человека. Низкая активация комплемента означает активацию комплемента, которая

в по меньшей мере 10 раз ниже, или в по меньшей мере 9 раз ниже, или в по меньшей мере 8 раз ниже, или в по меньшей мере 7 раз ниже, или в по меньшей мере 6 раз ниже, или в по меньшей мере 5 раз ниже, или в по меньшей мере 4 раза ниже, или в по меньшей мере 3 раза ниже, или в по меньшей мере 2 раза ниже по сравнению с положительным контролем (зимозан), при этом указанная активация комплемента определяется как считывание данных C3a, считывание данных Bb или считывание данных SC5b-9 в соответствии с протоколом, описанным в примере 2.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция характеризуется низкой активацией комплемента после введения указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или (дополнительной) композиции животному.

Анафилаксия является серьезной быстроразвивающейся аллергической реакцией, как известно специалисту в данной области. Очевидно, что анафилаксия, обуславливаемая введением системы доставки лекарственного средства, является нежелательной. Отсутствие анафилаксии или анафилактических реакций определяется для (дополнительной) термочувствительной липосомы или (дополнительной) композиции как отсутствие анафилаксии после введения указанной термочувствительной липосомы или указанной композиции, определяемое как указано в примере 2.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция не приводит к анафилаксии после введения указанной термочувствительной липосомы или композиции животному.

Предпочтительно термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению определяется как нетоксичная, если введение указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной)

композиции животному характеризуется низкой активацией комплемента и отсутствием анафилаксии. В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно
5 настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, которая является нетоксичной.

Система доставки лекарственного средства вводится животному для доставки активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной системе доставки лекарственного средства, к мишени, представляющей собой клетку, содержащуюся в
10 организме указанного животного или его части, или ткань, содержащуюся в организме указанного животного или его части, или орган, содержащийся в организме указанного животного или его части. В контексте настоящей заявки указанная клетка предпочтительно представляет собой опухолевую клетку, а указанная ткань или ее часть предпочтительно представляет собой опухоль. Доставка активного фармацевтического ингредиента
15 системой доставки лекарственного средства означает, что активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в указанной системе доставки лекарственного средства, которая предпочтительно представляет собой термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или
20 дополнительную композицию согласно настоящему изобретению, переносится от указанной системы доставки лекарственного средства к указанной мишени.

Несмотря на способ введения, термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению будет предпочтительно циркулировать в
25 кровяном русле указанного животного после введения. Для того чтобы указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция была доставлена к указанной клетке, указанной ткани, указанному органу или его указанной части, требуется, чтобы указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция не выводилась из кровяного русла
30 через короткий промежуток времени. Другими словами, требуется, чтобы указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризовалась длительным временем полураспада в кровотоке и/или не приводила к ускоренному клиренсу из крови (ABC). Обе концепции относятся к клиренсу,

который является фармакокинетическим показателем объема плазмы крови, из которого указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция полностью удаляется за единицу времени.

Длительное время полураспада в кровотоке означает, что *in vivo* время полураспада
5 указанного активного фармацевтического ингредиента в кровяном русле животного превышает 15 минут, 20 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 60 минут, 65 минут, 70 минут, 75 минут, 80 минут, 85 минут, 90 минут, 95 минут, 100 минут, 105 минут, 110 минут, 115 минут, 120 минут, 125 минут, 130 минут, 135 минут, 140 минут, 145 минут, 150 минут, 155 минут, 160 минут, 165 минут, 170 минут, 175 минут,
10 180 минут, 185 минут, 190 минут, 195 минут, 200 минут, 205 минут, 210 минут, 215 минут, 220 минут, 225 минут, 230 минут, 235 минут или 240 минут. В настоящем изобретении животное предпочтительно представляет собой человека, крысу, кошку, собаку или свинью. Предпочтительно *in vivo* время полураспада указанного активного фармацевтического ингредиента в кровяном русле животного составляет от 15 минут, 20
15 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 60 минут, 65 минут, 70 минут, 75 минут, 80 минут, 85 минут, 90 минут, 95 минут, 100 минут, 105 минут, 110 минут, 115 минут, 120 минут, 125 минут, 130 минут, 135 минут, 140 минут, 145 минут, 150 минут, 155 минут, 160 минут, 165 минут, 170 минут, 175 минут, 180 минут, 185 минут, 190 минут, 195 минут, 200 минут, 205 минут, 210 минут, 215 минут, 220 минут, 225 минут,
20 230 минут, 235 минут или 240 минут до не более 720 минут.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению,
25 характеризующаяся длительным временем полураспада в кровотоке.

Ускоренный клиренс из крови (ABC) представляет собой явление, заключающееся в том, что первое введение активного фармацевтического ингредиента или системы доставки лекарственного средства животному характеризуется значительно более низким клиренсом, чем последующее введение в течение заданного периода времени. Другими
30 словами, в случае ускоренного клиренса из крови указанное последующее введение характеризуется значительно более высоким клиренсом, т. е. «ускоренным» клиренсом. Без ограничения данной теорией ABC может объясняться иммунным ответом у указанного животного после указанного первого введения. Последующее введение предпочтительно

представляет собой второе, третье, четвертое, пятое или шестое введение относительно указанного первого введения.

Отсутствие ABC определяется для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению как тот факт, что время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после первого введения животному составляет не более чем 150%, или не более чем 140%, или не более чем 130%, или не более чем 120%, или не более чем 110%, или не более чем 105% в перерасчете на время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после второго введения указанному животному. Предпочтительно отсутствие ABC измеряется методом, указанным в примере 3, поскольку специалисту в данной области хорошо известно, что время полураспада в кровотоке может зависеть от используемых видов или штаммов.

Предпочтительно отсутствие ABC определяется для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению как тот факт, что время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после первого введения животному составляет не более чем 130% в перерасчете на время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после второго введения указанному животному, при этом указанное второе введение происходит через менее чем 30 дней, или менее чем 29 дней, или менее чем 28 дней, или менее чем 27 дней, или менее чем 26 дней, или менее чем 25 дней, или менее чем 24 дня, или менее чем 23 дня, или менее чем 22 дня, или менее чем 21 день, или менее чем 20 дней, или менее чем 19 дней, или менее чем 18 дней, или менее чем 17 дней, или менее чем 16 дней, или менее чем 15 дней, или менее чем 14 дней, или менее чем 13 дней, или менее чем 12 дней, или менее чем 11 дней, или менее чем 10 дней, или менее чем 9 дней, или менее чем 8 дней, или менее чем 7 дней, или менее чем 6 дней, или менее чем 5 дней, или менее чем 4 дня, или менее чем 3 дня, или менее чем 2 дня, или менее чем 1 день после указанного первого введения.

Более предпочтительно отсутствие ABC определяется для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению как тот

5 факт, что время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после двух введений животному составляет не более чем 150%, или не более чем 140%, или не более чем 130%, или не более чем 120%, или не более чем 110%, или не более чем 105% в перерасчете на время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной)

10 термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после третьего введения указанному животному.

Наиболее предпочтительно отсутствие ABC определяется для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему

15 изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению как тот факт, что время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после первого введения животному составляет не более чем 130% в перерасчете на время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или

20 указанной (дополнительной) композиции после третьего введения указанному животному, при этом указанное третье введение происходит через менее чем 30 дней, или менее чем 29 дней, или менее чем 28 дней, или менее чем 27 дней, или менее чем 26 дней, или менее чем 25 дней, или менее чем 24 дня, или менее чем 23 дня, или менее чем 22 дня, или менее чем 21 день, или менее чем 20 дней, или менее чем 19 дней, или менее чем 18 дней, или менее

25 чем 17 дней, или менее чем 16 дней, или менее чем 15 дней, или менее чем 14 дней, или менее чем 13 дней, или менее чем 12 дней, или менее чем 11 дней, или менее чем 10 дней, или менее чем 9 дней, или менее чем 8 дней, или менее чем 7 дней, или менее чем 6 дней, или менее чем 5 дней, или менее чем 4 дня, или менее чем 3 дня, или менее чем 2 дня, или менее чем 1 день после указанного первого введения.

30 Наиболее предпочтительно отсутствие ABC определяется для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению как тот факт, что время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной)

термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после первого введения животному составляет не более чем 130% в перерасчете на время полураспада в кровотоке указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции после второго, третьего, четвертого, пятого или шестого введения указанному животному, при этом указанное второе, третье, четвертое, пятое или шестое введение происходит через менее чем 30 дней после указанного первого введения.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, характеризующая отсутствием ABC.

Предпочтительно термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению определяется как обладающая подходящими свойствами клиренса, если введение указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции животному характеризуется длительным временем полураспада в кровотоке и отсутствием ABC. В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, обладающая подходящими свойствами клиренса.

Доставка активного фармацевтического ингредиента системой доставки лекарственного средства предпочтительно является селективной, а это означает, что скорость переноса указанного активного фармацевтического ингредиента от указанной системы доставки лекарственного средства к указанной мишени значительно выше, чем скорость переноса указанного активного фармацевтического ингредиента от указанной системы доставки лекарственного средства к соответствующим клетке, ткани, органу или его части, при этом указанные соответствующие клетка, ткань, орган или его часть относятся к такому же типу, но не являются частью указанной мишени, и/или выше, чем скорость переноса к клетке, ткани, органу или его части, находящимся в прилегающей области к указанной мишени. Например, селективная доставка к мишени-саркоме означает, что скорость переноса

активного фармацевтического ингредиента к нагретой саркоме является выше скорости переноса к находящимся в прилегающей области жировым клеткам, мышечным клеткам или тканям, которые не являются частью саркомы и которые не были нагреты. В настоящем документе нагревание определяет мишень. В контексте настоящей заявки оно определяется как селективная доставка лекарственного средства. В данном случае следует понимать, что скорость переноса к несоответствующим клеткам, тканям, органам или их частям, которые относятся к другому типу и/или не находятся в прилегающей области к мишени, может быть выше скорости переноса к указанной мишени.

Селективная доставка лекарственного средства приводит к местному накоплению указанного активного фармацевтического ингредиента в указанной мишени, при этом концентрация указанного активного фармацевтического ингредиента в указанной мишени значительно выше, чем концентрация указанного активного фармацевтического ингредиента в соответствующих клетке, ткани, органе или его части, при этом указанные соответствующие клетка, ткань, орган или его часть относятся к такому же типу, но не являются частью указанной мишени, где предпочтительно указанные соответствующие клетка, ткань, орган или его часть находятся в прилегающей области к указанной мишени. В контексте данного предпочтительного определения «значительно выше» предпочтительно означает на по меньшей мере 10% выше, на по меньшей мере 20% выше, на по меньшей мере 30% выше, на по меньшей мере 40% выше, на по меньшей мере 50% выше, на по меньшей мере 60% выше, на по меньшей мере 70% выше, на по меньшей мере 80% выше, на по меньшей мере 90% выше, на по меньшей мере 100% выше, на по меньшей мере 110% выше, на по меньшей мере 120% выше, на по меньшей мере 130% выше, на по меньшей мере 140% выше, на по меньшей мере 150% выше, на по меньшей мере 160% выше, на по меньшей мере 170% выше, на по меньшей мере 180% выше, на по меньшей мере 190% выше, или на по меньшей мере 200% выше, или на по меньшей мере 300% выше, или на по меньшей мере 400% выше, или на по меньшей мере 500% выше, или на по меньшей мере 600% выше, или на по меньшей мере 700% выше, или на по меньшей мере 800% выше, или на по меньшей мере 900% выше, или на по меньшей мере 1000% выше, или на по меньшей мере 1100% выше, или на по меньшей мере 1200% выше, или на по меньшей мере 1300% выше, или на по меньшей мере 1400% выше, или на по меньшей мере 1500% выше, или на по меньшей мере 1600% выше, или на по меньшей мере 1700% выше, или на по меньшей мере 1800% выше, или на по меньшей мере 1900% выше, или на по меньшей мере 2000% выше, или на по меньшей мере 2500% выше, или на по меньшей мере 3000% выше, или на по меньшей мере 3500% выше, или на по меньшей мере 4000% выше,

или на по меньшей мере 4500% выше, или на по меньшей мере 5000% выше. Еще более предпочтительно «значительно выше» в данном контексте означает выше на величину от 10% выше, или выше на величину от 20%, или выше на величину от 30%, или выше на величину от 40%, или выше на величину от 50%, или выше на величину от 60%, или выше на величину от 70%, или выше на величину от 80%, или выше на величину от 90%, или выше на величину от 100%, или выше на величину от 110%, или выше на величину от 120%, или выше на величину от 130%, или выше на величину от 140%, или выше на величину от 150%, или выше на величину от 160%, или выше на величину от 170%, или выше на величину от 180%, или выше на величину от 190%, или выше на величину от 200%, или выше на величину от 300%, или выше на величину от 400%, или выше на величину от 500%, или выше на величину от 600%, или выше на величину от 700%, или выше на величину от 800%, или выше на величину от 900%, или выше на величину от 1000%, или выше на величину от 1100%, или выше на величину от 1200%, или выше на величину от 1300%, или выше на величину от 1400%, или выше на величину от 1500%, или выше на величину от 1600%, или выше на величину от 1700%, или выше на величину от 1800%, или выше на величину от 1900%, или выше на величину от 2000%, или выше на величину от 2500%, или выше на величину от 3000%, или выше на величину от 3500%, или выше на по меньшей мере 4000%, или выше на величину от 4500%, или выше на величину от 5000% до не более 10000%.

Для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению указанная селективная доставка лекарственного средства может достигаться за счет местного нагревания указанной мишени, содержащейся в организме указанного животного, после введения указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или указанной (дополнительной) композиции указанному животному. Выше объяснялось, что высвобождение активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, может происходить при температурах немного выше температуры тела указанного животного. Таким образом, без ограничения данной теорией перенос указанного активного фармацевтического ингредиента от указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или (дополнительной) композиции может осуществляться только к тем клеткам, тканям, органам или их частям, которые местно нагреты до температуры, немного выше температуры тела указанного животного.

Понятно, что температура тела животного, предпочтительно человека, относится к нормальной температуре тела животного такого же вида, у которого не развивалась лихорадка.

Селективная доставка при тепловой обработке определяется в данном документе для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению как высвобождение активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или (дополнительной) композиции, к указанной мишени, при этом указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция вводится указанному животному первый раз, где указанная мишень затем местно нагревается, при этом указанное местное нагревание вызывает указанное высвобождение, что приводит к более высокой концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента в указанной мишени, чем концентрация указанного активного фармацевтического ингредиента в соответствующих клетке, ткани, органе или его части, при этом указанные соответствующие клетка, ткань, орган или его часть относятся к такому же типу, но не являются частью указанной мишени, при этом предпочтительно указанные соответствующие клетка, ткань, орган или его часть находятся в прилегающей области к указанной мишени.

В том смысле, где доставка или высвобождение активного фармацевтического ингредиента описана как вызванная, активированная, индуцированная или опосредованная (местным) нагреванием или (местной) тепловой обработкой указанной мишени, следует понимать, что это означает, что доставка или высвобождение активного фармацевтического ингредиента значительно выше в мишени и около нее благодаря повышенной температуре вследствие тепловой обработки. Это не означает, что в других клетках, тканях, органах или их частях, содержащихся в организме животного, которому вводят систему доставки лекарственного средства, доставка или высвобождения вовсе не происходит, и также не означает, что происходят лишь незначительные доставка или высвобождение. В контексте настоящей заявки «нагревание» и «тепловая обработка» могут использоваться взаимозаменяемо. «В мишени и около нее» относится к тем частям указанного животного, температура которых повышается, как определено выше, после нагревания мишени по сравнению с температурой перед применением указанного нагревания.

Тепловая обработка предпочтительно включает источник света, такой как лампа или лазер ближнего инфракрасного диапазона (NIR), водяную баню, устройство для рециркуляции жидкости, микроволновое устройство, радиочастотную абляцию и/или высокоинтенсивный фокусированный ультразвук.

5 Предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 6 минут, или 7 минут, или 8 минут, или 9 минут, или 10 минут, или 11 минут, или 12 минут, или 13 минут, или 14 минут, или 15 минут, или 16 минут, или 17 минут, или 18 минут, или 19 минут, или 20 минут, или 21 минут, или 22 минут, или 23 минут, или 24 минут, или 25 минут, или 26 минут, или 27 минут, или 28 минут, или 29 минут, или 30 минут, или 31 минут, или 32 минут, или 33 минут, или 34 минут, или 35 минут, или 36 минут, или 37 минут, или 38 минут, или 39 минут, или 40 минут, или 41 минут, или 42 минут, или 43 минут, или 44 минут, или 45 минут, или 46 минут, или 47 минут, или 48 минут, или 49 минут, или 50 минут, или 51 минут, или 52 минут, или 53 минут, или 54 минут, или 55 минут, или 56 минут, или 57 минут, или 58 минут, или 59 минут, или 60 минут, или 65 минут, или 70 минут, или 75 минут, или 80 минут, или 85 минут, или 90 минут, или 95 минут, или 100 минут, или 105 минут, или 110 минут, или 115 минут, или 120 минут. Предпочтительно указанная предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени до температуры 41°C.

Предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени до температуры 40,0°C, или 40,1°C, или 40,2°C, или 40,3°C, или 40,4°C, или 40,5°C, или 40,6°C, или 40,7°C, или 40,8°C, или 40,9°C, или 41,0°C, или 41,1°C, или 41,2°C, или 41,3°C, или 41,4°C, или 41,5°C, или 41,6°C, или 41,7°C, или 41,8°C, или 41,9°C, или 42,0°C, или 42,1°C, или 42,2°C, или 42,3°C, или 42,4°C, или 42,5°C, или 42,6°C, или 42,7°C, или 42,8°C, или 42,9°C, или 43,0°C. В данном контексте температура, приблизительно равная заданной, означает температуру, являющуюся выше заданной температуры на минус 0,5°C и ниже заданной температуры на плюс 0,5°C, предпочтительно температуру, являющуюся выше заданной температуры на минус 0,2°C и ниже заданной температуры на плюс 0,2°C, более предпочтительно температуру, являющуюся выше заданной температуры на минус 0,1°C и ниже заданной температуры на плюс 0,1°C. Предпочтительно указанная предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 60 минут.

Более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут при температуре 40°C. Другая более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20

минут, или 25 минут, или 30 минут, или 35 минут, или 40 минут, или 45 минут, или 50 минут, или 55 минут, или 60 минут при температуре 40,0°C.

Более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут при температуре 40°C. Другая более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут, или 35 минут, или 40 минут, или 45 минут, или 50 минут, или 55 минут, или 60 минут при температуре 41,0°C.

Более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут при температуре 40°C. Другая более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут, или 35 минут, или 40 минут, или 45 минут, или 50 минут, или 55 минут, или 60 минут при температуре 42,0°C.

Более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут при температуре 40°C. Другая более предпочтительная тепловая обработка включает нагревание указанной мишени в течение 5 минут, или 10 минут, или 15 минут, или 20 минут, или 25 минут, или 30 минут, или 35 минут, или 40 минут, или 45 минут, или 50 минут, или 55 минут, или 60 минут при температуре 43,0°C.

Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению обладает или характеризуется подходящим биораспределением, если после введения указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или (дополнительной) композиции животному активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в ней, доставляется селективно при тепловой обработке, как определено выше, к указанной мишени. Предпочтительно указанная мишень представляет собой опухолевую клетку или опухоль, а указанные клетка, ткань или орган, не содержащиеся в указанной мишени, предусматривают сердце, печень, селезенку, почку, легкое или мышцу, не подверженные тепловой обработке. Подходящее биораспределение может быть определено, как изложено в примере 4.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная

липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, характеризующаяся подходящим биораспределением.

Селективная доставка активного фармацевтического ингредиента из системы доставки лекарственного средства при тепловой обработке предпочтительно является высокой, а это означает, что к указанной мишени переносится большая часть активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной системе доставки лекарственного средства, чем к соответствующим клетке, ткани, органу или его части, где указанные соответствующие клетка, ткань, орган или его часть относятся к такому же типу, но не являются частью указанной мишени, где предпочтительно указанные клетка, ткань, орган или его часть находятся в прилегающей области к указанной мишени, после введения указанной системы доставки лекарственного средства животному. В контексте данного предпочтительного определения «больше» предпочтительно означает на по меньшей мере 10% больше, на по меньшей мере 20% больше, на по меньшей мере 30% больше, на по меньшей мере 40% больше, на по меньшей мере 50% больше, на по меньшей мере 60% больше, на по меньшей мере 70% больше, на по меньшей мере 80% больше, на по меньшей мере 90% больше, на по меньшей мере 100% больше, на по меньшей мере 110% больше, на по меньшей мере 120% больше, на по меньшей мере 130% больше, на по меньшей мере 140% больше, на по меньшей мере 150% больше, на по меньшей мере 160% больше, на по меньшей мере 170% больше, на по меньшей мере 180% больше, на по меньшей мере 190% больше, или на по меньшей мере 200% больше, или на по меньшей мере 300% больше, или на по меньшей мере 400% больше, или на по меньшей мере 500% больше, или на по меньшей мере 600% больше, или на по меньшей мере 700% больше, или на по меньшей мере 800% больше, или на по меньшей мере 900% больше, или на по меньшей мере 1000% больше, или на по меньшей мере 1100% больше, или на по меньшей мере 1200% больше, или на по меньшей мере 1300% больше, или на по меньшей мере 1400% больше, или на по меньшей мере 1500% больше, или на по меньшей мере 1600% больше, или на по меньшей мере 1700% больше, или на по меньшей мере 1800% больше, или на по меньшей мере 1900% больше, или на по меньшей мере 2000% больше, или на по меньшей мере 2500% больше, или на по меньшей мере 3000% больше, или на по меньшей мере 3500% больше, или на по меньшей мере 4000% больше, или на по меньшей мере 4500% больше, или на по меньшей мере 5000% больше. Еще более предпочтительно «больше» означает больше на величину от 200% до не более 10000%, больше на величину от 300% до не более 10000%, на величину от 400% до не более 10000%, на величину от 500% до не более 10000%, на

величину от 600% до не более 10000%, на величину от 700% до не более 10000%, на величину от 800% до не более 10000%, на величину от 900% до не более 10000%, на величину от 1000% до не более 10000%, на величину от 1500% до не более 10000%, на величину от 2000% до не более 10000%, на величину от 2500% до не более 10000%, на величину от 3000% до не более 10000%, на величину от 3500% до не более 10000%, на величину от 4000% до не более 10000%, на величину от 4500% до не более 10000% или на величину от 5000% до не более 10000%.

Предпочтительно система доставки лекарственного средства представляет собой термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению. В этом контексте термины доставка (лекарственного средства) (активного фармацевтического ингредиента), высвобождение (активного фармацевтического ингредиента), перенос (активного фармацевтического ингредиента) из указанной системы доставки лекарственного средства, (дополнительной) термочувствительной липосомы или (дополнительных) композиций могут использоваться взаимозаменяемо.

Система доставки лекарственного средства, которая представляет собой фармацевтическую композицию, предпочтительно является стабильной при хранении. В случае, если система доставки лекарственного средства представляет собой термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению, стабильность означает следующее:

- концентрация активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, не изменяется на более чем 15% при хранении, предпочтительно на не более чем 10%, наиболее предпочтительно на не более чем 5%, относительно концентрации активного фармацевтического ингредиента перед хранением; и/или
- диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной композиции, не изменяется на более чем 30% при хранении, предпочтительно на не более чем 20%, наиболее предпочтительно на не более чем

10%, относительно диаметра указанных (дополнительных) термочувствительных липосом перед хранением; и/или

- концентрация в бислое лизолипидов, содержащихся в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, не увеличивается на более чем 5%, более предпочтительно более чем 2%, наиболее предпочтительно более чем 1% при хранении; и/или

- полидисперсность указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или полидисперсность указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной (дополнительной) композиции, не увеличивается на более чем 0,5, предпочтительно на более чем 0,3, более предпочтительно на более чем 0,2 при хранении, и/или

- если указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризуется перед хранением высокоселективной доставкой при тепловой обработке, то указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция по-прежнему характеризуется высокоселективной доставкой при тепловой обработке после хранения; и/или

- если указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция представляет собой подходящую систему доставки лекарственного средства перед хранением, то указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция по-прежнему является подходящей системой доставки лекарственного средства после хранения.

Концентрацию активного фармацевтического ингредиента и лизолипидов можно определить с помощью ВЭЖХ. Диаметр и полидисперсность можно определить с помощью динамического рассеяния света. Высокоселективная доставка и подходящие системы доставки лекарственного средства описаны выше.

В контексте настоящей заявки хранение системы доставки лекарственных средств, термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению представляет собой период от получения указанной системы доставки лекарственного средства, (дополнительной) термочувствительной липосомы или (дополнительной) композиции до ее введения животному. В данном случае следует

понимать, что стабильность «при хранении» может подразумевать, что указанная система доставки лекарственного средства, (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция хранится при конкретном наборе условий хранения, таких как пониженная температура.

- 5 Предпочтительно хранение длится в течение по меньшей мере 1 дня, или в течение по меньшей мере 2 дней, или в течение по меньшей мере 3 дней, или в течение по меньшей мере 4 дней, или в течение по меньшей мере 5 дней, или в течение по меньшей мере 6 дней, или в течение по меньшей мере 7 дней, или в течение по меньшей мере 8 дней, или в течение по меньшей мере 9 дней, или в течение по меньшей мере 10 дней, или в течение по меньшей мере 11 дней, или в течение по меньшей мере 12 дней, или в течение по меньшей мере 13 дней, или в течение по меньшей мере 14 дней, или в течение по меньшей мере 15 дней, или в течение по меньшей мере 16 дней, или в течение по меньшей мере 17 дней, или в течение по меньшей мере 18 дней, или в течение по меньшей мере 19 дней, или в течение по меньшей мере 20 дней, или в течение по меньшей мере 21 дня, или в течение по меньшей мере 22 дней, или в течение по меньшей мере 23 дней, или в течение по меньшей мере 24 дней, или в течение по меньшей мере 25 дней, или в течение по меньшей мере 26 дней, или в течение по меньшей мере 27 дней, или в течение по меньшей мере 28 дней, или в течение по меньшей мере 29 дней, или в течение по меньшей мере 30 дней, или в течение по меньшей мере 5 недель, или в течение по меньшей мере 6 недель, или в течение по меньшей мере 7 недель, или в течение по меньшей мере 8 недель, или в течение по меньшей мере 9 недель, или в течение по меньшей мере 10 недель, или в течение по меньшей мере 11 недель, или в течение по меньшей мере 12 недель, или в течение по меньшей мере 13 недель, или в течение по меньшей мере 14 недель, или в течение по меньшей мере 15 недель, или в течение по меньшей мере 16 недель, или в течение по меньшей мере 5 месяцев, или в течение по меньшей мере 6 месяцев, или в течение по меньшей мере 7 месяцев, или в течение по меньшей мере 8 месяцев, или в течение по меньшей мере 9 месяцев, или в течение по меньшей мере 10 месяцев, или в течение по меньшей мере 11 месяцев, или в течение по меньшей мере 12 месяцев, или в течение по меньшей мере 13 месяцев, или в течение по меньшей мере 14 месяцев, или в течение по меньшей мере 15 месяцев, или в течение по меньшей мере 16 месяцев, или в течение по меньшей мере 17 месяцев, или в течение по меньшей мере 18 месяцев, или в течение по меньшей мере 19 месяцев, или в течение по меньшей мере 20 месяцев, или в течение по меньшей мере 21 месяца, или в течение по меньшей мере 22 месяцев, или в течение по меньшей мере 23 месяцев, или в течение по меньшей мере 24 месяцев, или в течение по меньшей мере 25 месяцев, или в

течение по меньшей мере 26 месяцев, или в течение по меньшей мере 27 месяцев, или в течение по меньшей мере 28 месяцев, или в течение по меньшей мере 29 месяцев, или в течение по меньшей мере 30 месяцев.

Предпочтительно хранение длится или от 1 дня, или от 2 дней, или от 3 дней, или от 4
5 дней, или от 5 дней, или от 6 дней, или от 7 дней, или от 8 дней, или от 9 дней, или от 10
дней, или от 11 дней, или от 12 дней, или от 13 дней, или от 14 дней, или от 15 дней, или от
16 дней, или от 17 дней, или от 18 дней, или от 19 дней, или от 20 дней, или от 21 дня, или
от 22 дней, или от 23 дней, или от 24 дней, или от 25 дней, или от 26 дней, или от 27 дней,
или от 28 дней, или от 29 дней, или от 30 дней, или от 5 недель, или от 6 недель, или от 7
10 недель, или от 8 недель, или от 9 недель, или от 10 недель, или от 11 недель, или от 12
недель, или от 13 недель, или от 14 недель, или от 15 недель, или от 16 недель, или от 5
месяцев, или от 6 месяцев, или от 7 месяцев, или от 8 месяцев, или от 9 месяцев, или от 10
месяцев, или от 11 месяцев, или от 12 месяцев, или от 13 месяцев, или от 14 месяцев, или
от 15 месяцев, или от 16 месяцев, или от 17 месяцев, или от 18 месяцев, или от 19 месяцев,
15 или от 20 месяцев, или от 21 месяца, или от 22 месяцев, или от 23 месяцев, или от 24
месяцев, или от 25 месяцев, или от 26 месяцев, или от 27 месяцев, или от 28 месяцев, или
от 29 месяцев, или от 30 месяцев до не более 5 лет.

Предпочтительно хранение осуществляется при температуре приблизительно 25°C, или
приблизительно 20°C, или приблизительно 15°C, или приблизительно 10°C, или
20 приблизительно 5°C, или приблизительно 0°C, или приблизительно -5°C, или
приблизительно -10°C, или приблизительно -15°C, или приблизительно -20°C. В этом
контексте температура, приблизительно равная заданной температуре, означает
температуру выше заданной температуры минус 5°C и ниже заданной температуры плюс
5°C, предпочтительно температуру выше заданной температуры минус 2°C и ниже
25 заданной температуры плюс 2°C, более предпочтительно температуру выше заданной
температуры минус 1°C и ниже заданной температуры плюс 1°C. Предпочтительно
температура приблизительно -20°C означает температуру от -15°C до не более -25°C.

Если хранение происходит при температуре ниже 0°C, стабильность также
подразумевает, что условия стабильности удовлетворяются в ходе и после замораживания
30 и оттаивания системы доставки лекарственного средства, (дополнительной)
термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению или (дополнительной)
композиции согласно настоящему изобретению. Данное свойство также называется
стабильностью при замораживании и оттаивании и может охватывать несколько циклов
замораживания-оттаивания.

Предпочтительно термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению является стабильной по прошествии по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 циклов замораживания-оттаивания.

Стабильность дисперсии на основе термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению означает, что диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной (дополнительной) композиции, не изменяется на более чем 30% при хранении, предпочтительно на более чем 20%, наиболее предпочтительно на более чем 10%, относительно диаметра указанных (дополнительных) термочувствительных липосом перед хранением.

Утечка активного фармацевтического ингредиента из термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению представляет собой перенос из указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или из (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной (дополнительной) композиции, при хранении, что приводит к снижению концентрации активного фармацевтического ингредиента в ней. Предпочтительно снижение концентрации активного фармацевтического ингредиента из-за утечки составляет не более чем 15% при хранении, более предпочтительно не более чем 10%, наиболее предпочтительно не более чем 5%, относительно общей концентрации активного фармацевтического ингредиента перед хранением.

Разложение активного фармацевтического ингредиента в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению представляет собой снижение концентрации указанного активного фармацевтического ингредиента в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции при отсутствии переноса указанного активного

фармацевтического ингредиента через бислой указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или через бислой термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной (дополнительной) композиции. Другими словами, разложение включает химическое преобразование, при котором активный фармацевтический ингредиент превращается в молекулу при отсутствии фармацевтического эффекта, уменьшенном, ином или неблагоприятном фармацевтическом эффекте. Предпочтительно снижение концентрации активного фармацевтического ингредиента из-за разложения составляет не более чем 15% при хранении, более предпочтительно не более чем 10%, наиболее предпочтительно не более чем 5%, относительно концентрации активного фармацевтического ингредиента перед хранением.

Термин «при хранении» предпочтительно означает по меньшей мере 4 недели при температуре приблизительно 5°C или в течение по меньшей мере 12 месяцев при температуре приблизительно -20°C. Более предпочтительно «при хранении» предпочтительно означает от 4 недель до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C или от 12 месяцев до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома, дополнительная термочувствительная липосома, композиция или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, которая является стабильной при хранении в течение по меньшей мере 4 недель при температуре приблизительно 5°C, или в течение по меньшей мере 12 месяцев при температуре приблизительно -20°C, или в течение от 4 недель до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или в течение от 12 месяцев до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C, где

- концентрация активного фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, не изменяется на более чем 15% при хранении, предпочтительно на не более чем 10%, наиболее предпочтительно на не более чем 5%, относительно концентрации активного фармацевтического ингредиента перед хранением; и
- диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной композиции, не изменяется на более чем 30% при хранении, предпочтительно на более чем 20%, наиболее предпочтительно на более чем 10%,

относительно диаметра указанных (дополнительных) термочувствительных липосом перед хранением; и

- концентрация в бислое лизолипидов, содержащихся в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, не увеличивается выше 5%, более предпочтительно выше 2%, наиболее предпочтительно выше 1%, при хранении; и

- полидисперсность указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или полидисперсность указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной композиции, не увеличивается на более чем 0,5, предпочтительно более чем 0,3, более предпочтительно более чем 0,2 при хранении, и

- если указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризуется перед хранением высокоселективной доставкой при тепловой обработке, то указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция по-прежнему характеризуется высокоселективной доставкой при тепловой обработке после хранения; и

- если указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция представляет собой подходящую систему доставки лекарственного средства перед хранением, то указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция по-прежнему является подходящей системой доставки лекарственного средства после хранения.

Термочувствительная липосома, дополнительная термочувствительная липосома, композиция или дополнительная композиция согласно данному варианту осуществления упоминается как высокостабильная при хранении или (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция, характеризующаяся высокой стабильностью при хранении, в контексте настоящей заявки.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома, дополнительная термочувствительная липосома, композиция или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, которая является стабильной при хранении от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C, или от 12 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C, где концентрация активного

фармацевтического ингредиента, содержащегося в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, не изменяется на более чем 15% при хранении, и/или где диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы или диаметр указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной композиции, не изменяется на более чем 30% при хранении, где концентрация в бислое лизолипидов, содержащихся в указанной (дополнительной) термочувствительной липосоме или указанной (дополнительной) композиции, не повышается на более 5%, и/или где полидисперсность указанной термочувствительной липосомы или полидисперсность указанной (дополнительной) термочувствительной липосомы, содержащейся в указанной (дополнительной) композиции, не повышается на более чем 0,5. Предпочтительно, если указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризуется перед хранением высокоселективной доставкой при тепловой обработке, тогда указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция по-прежнему характеризуется высокоселективной доставкой при тепловой обработке после хранения, и/или где, если указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция является подходящей системой доставки лекарственного средства перед хранением, то указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция по-прежнему является подходящей системой доставки лекарственного средства после хранения.

В отличие от термочувствительных липосом, упоминаемых в документе [4] и [5] предшествующего уровня техники, примеры ниже явно показывают, что термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению является стабильной при хранении. В частности, в примере 7 показано, что по меньшей мере внутрилипосомальное соотношение API:липид 0,05-0,3, характерное для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, связано со стабильностью при хранении в течение по меньшей мере 4 недель при 2-8°C. Напротив, в [4] утверждается, что «Хранение TSL с инкапсулированным 300 мМ цитратом, pH 4, при 4°C в течение недель приводило к гидролизу фосфолипидов и образованию лизолипидов», тогда как в [5] отмечено, что «В течение первых 20 минут после загрузки образования Lyso-PC обнаружено не было, но позже, спустя 60 минут, содержание повышалось на 1,1%±1,2%».

Кроме того, несколько предпочтительных аспектов и вариантов осуществления термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, как описано выше, связаны с еще большей стабильностью при хранении:

- 5 - В примере 5 показано, что применение внутрилипосомально рН в диапазоне от 6,0 до 7,4 обеспечивало стабильность фосфолипидов в течение по меньшей мере 4 недель при 2-8°C. Соответствующий состав с внутрилипосомальным рН 3 показал более чем 10% продуктов разложения липидов после 12 недель хранения при 2-8°C (28,16±1,95% свободных жирных кислот и 14,1±5,1% лизолипидов), тогда как для состава с рН 6 никакого изменения не наблюдали при анализе через 24 недели.
10 Утечка API во время хранения также увеличивалась через 12 недель для состава с рН 3, тогда как для состава с рН 6 утечки не было обнаружено. Наряду с тем, что было обнаружено, в примере 7 также показано, что более нейтральный рН, используемый как внутрилипосомальный буфер, приводит к более медленному разложению липидного вспомогательного вещества при 2-8°C, чем при более
15 кислотном рН.
- В примере 8 продемонстрирована стабильность при хранении при 2-8°C, если диаметр термочувствительной липосомы составляет от 100 нанометров до не более 200 нанометров. Например, при уменьшении размера пузырька до среднего значения z, составляющего меньше 100 нм, состав имеет склонность к разложению
20 API и липидного вспомогательного вещества, что, в свою очередь, отрицательно влияет на профиль высвобождения, зависящий от температуры.
- В примере 9 показана стабильность при хранении при 2-8°C, если используется буфер для хранения с концентрацией соли не более 100 мМ и осмолярностью по меньшей мере 300 мОсмоль/кг. Например, снижение концентрации соли в буфере
25 для хранения от физиологической концентрации (140 мМ) до ≤ 66 мМ стабилизировало DPPG₂-TSL₃₀%-DOX для хранения при 2-8°C, что обеспечивало дисперсию, которая показывала заметно более медленное увеличение размера пузырька.
- В примере 9 дополнительно показано, что присутствие криопротектора, такого как
30 трегалоза, повышает стабильность при хранении. В частности, по меньшей мере присутствие $\geq 8\%$ (вес./об.) трегалозы связано с композицией, которая стабильна по простейшей по меньшей мере 6 циклов замораживания-оттаивания.

Кроме того, в пример 6 продемонстрировано, что использование концентрации соли не более 120 мМ в буфере для загрузки ускоряет активную загрузку доксорубицина и, таким

образом, снижает разложение API и липидов. Общее содержание связанных с API примесей в партии зависит от времени инкубации, с <0,10% площади и 4,1% площади в течение 30 мин. и 90 мин. соответственно. Общее содержание примесей, связанных с липидами, в партии также зависит от времени инкубации, с <0,10% площади и 0,13% площади в течение 30 мин. и 90 мин. соответственно. Для достижения хранения состава предпочтительна замена буфера буфером для хранения с концентрацией соли, составляющей менее чем 100 мМ, и осмолярностью, составляющей более чем 300 мОсмоль/кг.

Противораковая активность

Система доставки лекарственного средства, описанная в настоящей заявке, предпочтительна для доставки противоракового лекарственного средства к опухоли, предпочтительно к солидной опухоли. Предпочтительно указанная система доставки лекарственного средства содержит термочувствительную липосому, и указанная доставка индуцируется или облегчается нагреванием указанной опухоли.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению, где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция проявляет обнаруживаемую противоопухолевую активность. В контексте настоящего изобретения противоопухолевая активность наблюдается исключительно в опухоли или в опухолевой клетке, содержащейся в ней, а не в соответствующих здоровых, контрольных, эталонных, не относящихся к опухолевым клетке, ткани или органе. В контексте настоящего изобретения противоопухолевая активность предусматривает по меньшей мере одно из следующего:

- снижение жизнеспособности указанной опухолевой клетки,
- индукцию апоптоза в указанной опухолевой клетке или индукцию гибели опухолевой клетки,
- ингибирование пролиферации указанной опухолевой клетки,
- подавление или задержку увеличения веса, или снижение веса, и/или замедленный или подавленный рост указанной опухоли.

Проявление такой обнаруживаемой противоопухолевой активности является крайне важным в настоящем изобретении для того, чтобы иметь возможность лечить, облегчать, задерживать, излечивать и/или предупреждать рак, предпочтительно солидные опухоли. Термины «противоопухолевая активность» или «эффект в отношении опухолевой клетки»

используются взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения. Очевидно, что использование термина «противоопухолевая активность или эффект» и «эффект в отношении опухолевой клетки» касаясь термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению не подразумевает, что указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция проникает в указанную опухоль или опухолевую клетку. Как описано выше, хорошо известно, что указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция может функционировать как система доставки лекарственного средства для активного фармацевтического ингредиента с такой противоопухолевой активностью.

Оценка противоопухолевой активности может проводиться у подвергнутого лечению субъекта периодически, например, каждую неделю, каждые две недели, три недели, четыре недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или каждый год.

Таким образом, можно периодически оценивать повышение/снижение противоопухолевой активности, например, каждые неделю, месяц. Такую оценку предпочтительно проводят в нескольких временных точках для заданного субъекта или в одной или нескольких временных точках для заданного субъекта и здорового контрольного субъекта. Альтернативно такую противоопухолевую активность можно измерить путем сравнения указанной противоопухолевой активности в опухолевой клетке субъекта с соответствующей активностью в клетке, не относящейся к опухолевой, или здоровой клетке того самого субъекта в заданной временной точке после начала лечения.

Если противоопухолевая активность была обнаружена по меньшей мере один раз, дважды или трижды, то считается, что термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению проявляет обнаруживаемую противоопухолевую активность.

Таким образом, обнаруживаемая противоопухолевая активность предпочтительно обнаруживается тогда, когда она обнаруживается для по меньшей мере одной временной точки. Предпочтительно такая обнаруживаемая противоопухолевая активность обнаруживается для по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти временных точек. В

предпочтительном варианте осуществления противоопухолевая активность оценивается в опухолевых клетках субъекта. Более предпочтительно указанные опухолевые клетки представляют собой клетки саркомы или клетки карциномы. В предпочтительном варианте осуществления указанные клетки карциномы представляют собой клетки карциномы легкого, гепатоцеллюлярной карциномы или карциномы толстой кишки. В более предпочтительном варианте осуществления указанные клетки карциномы представляют собой клетки карциномы легкого или гепатоцеллюлярной карциномы. В предпочтительном варианте осуществления указанные клетки саркомы представляют собой клетки ангиосаркомы, саркомы костей, возвышающейся дерматофибросаркомы, эпителиоидной саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST), саркомы Капоши, лейомиосаркомы, липосаркомы, злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, миксофибросаркомы, плеоморфной саркомы, рабдомиосаркомы, солитарной фиброзной опухоли, синовиальной саркомы или недифференцированной плеоморфной саркомы.

При введении контрольной термочувствительной липосомы, как определено далее, снижение жизнеспособности или выживаемости опухолевых клеток может представлять собой по меньшей мере снижение на по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, или 75%, или больше в пересчете на соответствующие жизнеспособность опухолевых клеток или выживаемость опухолевых клеток.

Индукция апоптоза в опухолевых клетках или индукция гибели опухолевых клеток может составлять по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, или 75%, или больше. Например, индукция апоптоза в опухолевых клетках или индукция гибели опухолевых клеток, составляющая 50%, означает, что половина указанных опухолевых клеток, обработанных термочувствительной липосомой согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомой согласно настоящему изобретению, композицией согласно настоящему изобретению или дополнительной композицией согласно настоящему изобретению подвергается апоптозу или гибели клеток. Жизнеспособность, или выживаемость, или гибель опухолевых клеток можно оценить с помощью методик, известных специалисту в данной области.

Жизнеспособность или гибель опухолевых клеток можно оценить с помощью стандартных методик получения изображений, таких как ЯМР-томография, КТ или ПЭТ, и их производных, или с помощью биопсии. Жизнеспособность опухолевых клеток можно оценить с помощью визуализации разрастания очага в нескольких временных точках. Уменьшение очага на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%,

или больше относительно разрастания очага на момент первой временной точки, наблюдаемое по меньшей мере однократно, будет рассматриваться как снижение жизнеспособности опухолевых клеток. Жизнеспособность опухолевых клеток можно оценить путем непрямого измерения АТФ, например с помощью набора Cell Titer-Glo от Promega. Апоптоз опухолевых клеток можно оценить путем измерения активности каспазы-3/7.

При введении контрольной термочувствительной липосомы, как определено далее, ингибирование пролиферации опухолевых клеток может составлять по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%, или больше относительно соответствующей пролиферации опухолевой клетки. Пролиферацию клеток можно оценить с помощью известных методик, таких как стандартный анализ пролиферации. В таком анализе пролиферации можно использовать витальные красители, такие как Cell Titer Blue (Promega). Предусматривается превращение молекулы субстрата во флуоресцентную молекулу посредством метаболических ферментов. Уровень флуоресценции затем отражает количество живых и метаболически активных клеток. Альтернативно такой анализ пролиферации может определять митотический индекс. Митотический индекс основан на количестве опухолевых клеток на стадии пролиферации по сравнению с общим количеством опухолевых клеток. Мечение пролиферативных клеток можно проводить с помощью антитела Ki-67 и иммуногистохимического окрашивания. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток можно наблюдать, когда митотический индекс снижается на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 50% или больше (как описано у Kearsley J.H., et al, 1990).

В некоторых вариантах осуществления подавление, или снижение веса опухоли, или задержка роста опухоли, или ингибирование роста опухоли может составлять по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%, или больше относительно опухоли, в случае введения контрольной термочувствительной липосомы, как определено далее. Вес опухоли или рост опухоли можно оценить с помощью методик, известных специалисту в данной области.

Обнаружение роста опухоли или обнаружение пролиферации опухолевых клеток можно оценить *in vivo* путем измерения изменений использования глюкозы с помощью позитрон-эмиссионной томографии с применением аналога глюкозы, 2-[18F]-фтор-2-дезоксид-глюкозы (FDG-PET), или с помощью ПЭТ с применением [18F]-3-фтор-3-дезоксид-L-тимидина. *Ex vivo* альтернативой может быть окрашивание биоптата опухоли с помощью Ki67.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата.

В более предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению для применения в лечении, облегчении, задержке, излечении и/или предупреждении рака.

Предпочтительный вид рака выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы Ходжкина, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака желудка, рака легкого, рака яичников, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака простаты, рака желудочно-кишечного тракта, саркомы мягких тканей и множественной миеломы. Более предпочтительно рак представляет собой саркому мягких тканей.

Предпочтительно саркома мягких тканей выбрана из группы, состоящей из ангиосаркомы, саркомы костей, возвышающейся дерматофибросаркомы, эпителиоидной саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST), саркомы Капоши, лейомиосаркомы, липосаркомы, злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, миксофибросаркомы, плеоморфной саркомы, рабдомиосаркомы, солитарной фиброзной опухоли, синовиальной саркомы и недифференцированной плеоморфной саркомы.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению для применения в лечении, облегчении, задержке, излечении и/или предупреждении саркомы мягких тканей.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению для применения в лечении, облегчении, задержке, излечении и/или предупреждении рака,

предпочтительно саркомы мягких тканей, где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризуется противоопухолевой активностью, и где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризуется одним или несколькими из следующих свойств:

- низкая активация комплемента,
- отсутствие анафилаксии,
- отсутствие токсичности,
- длительное время полураспада в кровотоке,
- отсутствие АВС,
- соответствующий клиренс,
- соответствующее биораспределение,
- высокоселективная доставка при тепловой обработке,
- высокая стабильность при хранении.

В предпочтительном варианте осуществления предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению для применения в лечении, облегчении, задержке, излечении и/или предупреждении рака, предпочтительно саркомы мягких тканей, где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция характеризуется противоопухолевой активностью, и где указанная (дополнительная) термочувствительная липосома или указанная (дополнительная) композиция является подходящей системой доставки лекарственного средства. Другими словами, (дополнительная) термочувствительная липосома или (дополнительная) композиция согласно данному варианту осуществления характеризуется противоопухолевой активностью, характеризуется соответствующим клиренсом и высокой стабильностью при хранении.

Критерии для оценки терапевтического ответа известны как критерии RECIST (Wahl R.L. et al, 2009). В контексте настоящего изобретения пациент может выжить и/или может рассматриваться как остающийся здоровым в течение более продолжительного интервала времени. Альтернативно, заболевание или состояние могло быть остановлено или задержано. В контексте настоящего изобретения улучшение качества жизни и наблюдаемое облегчение боли могут означать, что пациенту может потребоваться меньше

обезболивающих лекарственных средств, чем в начале лечения. Альтернативно или в сочетании с приемом меньшего количества обезболивающих лекарственных средств у пациента могут быть менее выраженные запоры, чем в начале лечения. «Меньше» в данном контексте может означать на 5% меньше, на 10% меньше, на 20% меньше, на 30% меньше, на 40% меньше, на 50% меньше, на 60% меньше, на 70% меньше, на 80% меньше, на 90% меньше. Пациент может больше не нуждаться в каких-либо обезболивающих лекарственных средствах. Такое улучшение качества жизни и наблюдаемое облегчение боли можно наблюдать, обнаружить или оценить у пациента после по меньшей мере одной недели, двух недель, трех недель, четырех недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев лечения или более и сравнить с качеством жизни и наблюдаемым облегчением боли в начале лечения указанного пациента.

Задержка в возникновении метастазов и/или миграции опухолевых клеток может быть задержкой в по меньшей мере одну неделю, один месяц, несколько месяцев, один год или дольше. Наличие метастазов можно оценить с помощью ЯМР-томографии, КТ, или эхографии, или методик, обеспечивающих обнаружение циркулирующих опухолевых клеток (СТС), свободно-циркулирующей ДНК или свободно-циркулирующей РНК. Примерами последних исследований являются тест CTC CellSearch (Veridex), магнитная сортировка СТС на основе EpCam из периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления рост опухоли может задерживаться на по меньшей мере одну неделю, один месяц, два месяца или более. В некоторых вариантах осуществления возникновение метастазов задерживается на по меньшей мере одну неделю, две недели, три недели, четыре недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более.

Применение

В дополнительном аспекте предусмотрено применение термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению, как описано в предыдущих разделах, для применения в качестве лекарственного препарата или части терапии. В данном документе также предусмотрено применение термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению, как

описано в предыдущем разделе, для изготовления лекарственного препарата для лечения рака, предпочтительно саркомы мягких тканей.

Предпочтительно термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению предназначена для применения в качестве лекарственного препарата или части терапии для предупреждения, задержки, излечения, облегчения и/или лечения рака, предпочтительно саркомы мягких тканей.

В варианте осуществления данного аспекта настоящего изобретения предусмотрена термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата, предпочтительно для лечения, предупреждения и/или задержки рака, предпочтительно саркомы мягких тканей.

Способ

В дополнительном аспекте предусмотрен способ предупреждения, лечения, излечения, облегчения и/или задержки состояния или заболевания, как определено в предыдущем разделе, у индивидуума, в клетке, ткани или органе указанного индивидуума. Способ включает введение термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению указанному индивидууму или субъекту, нуждающемуся в этом.

Любые предпочтение или предпочтительный вариант осуществления, раскрывающие (дополнительную) термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, или раскрывающие (дополнительную) композицию, содержащую (дополнительную) термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, или раскрывающие способ согласно настоящему изобретению, можно объединять со способом предупреждения, лечения, излечения, облегчения и/или задержки состояния или заболевания у индивидуума, в клетке, ткани или органе указанного индивидуума, а это означает, что любые такие предпочтение или предпочтительные варианты осуществления также раскрывают соответствующий способ предупреждения, лечения, излечения, облегчения и/или задержки состояния или заболевания.

В варианте осуществления данного аспекта настоящего изобретения предусмотрен способ предупреждения, лечения и/или задержки рака, предпочтительно саркомы мягких

тканей, включающий введение субъекту термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, дополнительной термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или дополнительной композиции согласно настоящему изобретению.

5 В предпочтительном варианте осуществления термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению вводят в клетку, присутствующую в органе или в ткани, где присутствует опухоль. Предпочтительно
10 указанные орган или ткань содержат 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% опухолевых клеток. Термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению может быть нацелена на опухолевые
15 клетки, например, путем сочетания или сопряжения бислоя, содержащегося в указанной термочувствительной липосоме, с антителом или другим фрагментом, связывающимся с опухолью. Предпочтительно указанная опухоль связана с саркомой мягких тканей.

В предпочтительном варианте осуществления термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную термочувствительную липосому согласно
20 настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению вводят в клетку, присутствующую в органе или в ткани, где присутствует опухоль, при этом указанная опухоль еще не метастазировала. В другом предпочтительном варианте осуществления термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную
25 термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению вводят в клетку, присутствующую в органе или в ткани, где присутствует опухоль, при этом указанная опухоль метастазировала. Предпочтительно указанная опухоль связана с саркомой мягких тканей.

30 В предпочтительном варианте осуществления термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, дополнительную термочувствительную липосому согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или дополнительную композицию согласно настоящему изобретению вводят системно. Альтернативно, в другом варианте осуществления лечение проводится местно.

В другом предпочтительном варианте осуществления термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, дополнительная термочувствительная липосома согласно настоящему изобретению, композиция согласно настоящему изобретению или дополнительная композиция согласно настоящему изобретению может вводиться в комбинации со стандартными видами лечения заболевания или состояния, связанного с раком, предпочтительно с саркомой мягких тканей, такими как химиотерапия, лучевая терапия или хирургия.

Определения

В данном документе и в формуле изобретения глагол «содержать» и его спряжения используются в их неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, а элементы, не упомянутые специально, не исключены.

- 5 Кроме того, глагол «состоять» может быть заменен на «состоять главным образом из», что означает, что (термочувствительная) липосома или композиция, как определено в данном документе, может содержать дополнительный(-ые) компонент(ы) помимо идентифицированных специально, причем указанный(-ые) дополнительный(-ые) компонент(ы) не изменяет(-ют) характерный признак настоящего изобретения. Кроме того,
- 10 ссылка на элемент в единственном числе не исключает возможности присутствия нескольких элементов, если только контекст явно не требует наличия одного и только одного из элементов. Таким образом, единственное число обычно означает «по меньшей мере один».

- Каждый из вариантов осуществления, как определено в данном документе, можно
- 15 объединять с другими, если не указано иное. Все ссылки на патенты и литературные источники в данном описании тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

- В контексте настоящего изобретения термин «идентичная» не должен рассматриваться настолько узко, чтобы следовало учитывать лишь распространенность изотопов в природе
- 20 – термин «идентичная» предпочтительно должен относиться только к молекулярной структуре, которая будет представлена изображенной структурной формулой.

- Всякий раз, когда в контексте настоящего изобретения рассматривается параметр вещества, подразумевается, что, если не указано иное, этот параметр определяется, измеряется или проявляется при физиологических условиях. Физиологические условия
- 25 известны специалисту в данной области и включают системы водных растворителей, атмосферное давление, значения pH от 6 до 8, температуру в диапазоне от комнатной температуры до приблизительно 37°C (от приблизительно 20°C до приблизительно 40°C) и подходящую концентрацию буферных солей или других компонентов. Понятно, что заряд часто связан с состоянием равновесия. Фрагмент, который указан как несущий или
- 30 имеющий заряд, является фрагментом, который чаще обнаруживается в состоянии, когда он несет или имеет такой заряд, чем в состоянии, когда он не несет или не имеет такого заряда. Таким образом, атом, который указан в данном описании как заряженный, может быть незаряженным при конкретных условиях, а нейтральный фрагмент может быть заряженным при конкретных условиях, что понятно специалисту в данной области.

В контексте настоящего изобретения уменьшение или увеличение параметра, подлежащего оценке, означает изменение на по меньшей мере 5% относительно значения, соответствующего этому параметру. Более предпочтительно уменьшение или увеличение значения означает изменение на по меньшей мере 10%, еще более предпочтительно на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 90% или 100%. В этом последнем случае может случиться так, что больше не будет обнаруживаемого значения, связанного с параметром.

Применение вещества в качестве лекарственного препарата, как описано в данном документе, также может интерпретироваться как применение указанного вещества в изготовлении лекарственного препарата. Аналогично, всякий раз, когда вещество используется для лечения или в качестве лекарственного препарата, его также можно использовать для изготовления лекарственного препарата для лечения.

Слово «приблизительно» или «примерно» при использовании совместно с численным значением (например, приблизительно 10) предпочтительно означает, что значение может быть на 0,1% больше или меньше заданного значения (10).

Слово «приблизительно» при использовании совместно с заданной температурой предпочтительно означает в диапазоне от указанного заданного значения минус 3°C до не более указанного заданного значения плюс 3°C, более предпочтительно в диапазоне от указанного заданного значения минус 2°C до не более указанного заданного значения плюс 2°C, наиболее предпочтительно в диапазоне от указанного заданного значения минус 1°C до не более указанного заданного значения плюс 1°C.

Предлог «между» при использовании совместно с целыми числами относится к диапазону, включающему указанные граничные значения. Например, если n представляет собой значение от 1 до 3, n может быть 1, 2 или 3. Другими словами, «между X и Y » является синонимом «от X до не более Y ».

Термин «по меньшей мере» перед списком чисел применим ко всем числам из указанного списка, а это означает, что «по меньшей мере 1, 2 или 3» имеет такое же значение, что и «по меньшей мере 1, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3». Это применимо с соответствующими поправками к таким терминам, как «от» и «до не более». Например, «от 1, 2 или 3 до не более 4» имеет такое же значение, что и «от 1 до не более 4, от 2 до не более 4, или от 3 до не более 4».

В контексте настоящего изобретения «представленный структурой X », «структуры X » и «со структурой X » используются взаимозаменяемо.

Концентрация в контексте настоящего изобретения представляет собой молярную

концентрацию, если явно не определено иное. Процент в отношении концентрации в контексте настоящего изобретения представляет собой молярный процент, если явно не определено иное. Таким образом, «%» означает «мол. %», если явно не определено иное.

5 Концентрация соединения, содержащегося в бислое, предпочтительно определена относительно общего числа липидов в указанном бислое, если явно не определено иное.

В частности, концентрация DPPG₂ в настоящей заявке относится к молярной концентрации DPPG₂ в бислое, где предпочтительно указанный бислой содержится в термочувствительной липосоме согласно настоящему изобретению, относительно общего количества липидов, содержащихся в указанном бислое.

10 В контексте настоящего изобретения растворы, и/или композиции, и/или бислои, характеризующиеся «по сути таким же липидным составом», означают, что для каждого типа липида молярная концентрация указанного липида отличается на менее чем 10%, 9,5%, 9%, 8,5%, 8%, 7,5%, 7%, 6,5%, 6%, 5,5%, 5%, 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, или 0,1% между указанными растворами,
15 и/или композициями, и/или бислоями.

Соединения или композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно предназначены для использования в способах или применениях согласно настоящему изобретению.

В контексте настоящей заявки термины «клетка», «клеточная линия» и «клеточная
20 культура» могут использоваться взаимозаменяемо. Все эти термины также включают их потомство, которое представляет собой любое или все последующие поколения, полученные путем клеточного деления. Очевидно, что все потомство может не быть идентичным из-за умышленных или неумышленных мутаций.

В контексте настоящей заявки «сферический» означает приблизительно или по сути
25 сферический и не должен быть истолкован как абсолютное геометрическое свойство. В частности, липосома не ограничена абсолютно сферическими системами, но также включает приблизительно сферические системы.

Молярная концентрация соединения в композиции, в структуре или в (молекулярной) системе определяется как соотношение количества молекул указанного соединения и
30 общего количества молекул, содержащихся в указанных композициях, указанной структуре или указанной системе.

Молярное соотношение первого соединения и второго соединения в композиции, в структуре или в (молекулярной) системе определяется как соотношение количества молекул указанного первого соединения, содержащегося в указанной композиции,

указанной структуре или указанной системе, и количества молекул указанного второго соединения в указанной композиции, указанной структуре или указанной системе.

Животное предпочтительно представляет собой млекопитающее, более предпочтительно выбранное из группы, состоящей из мыши, крысы, собаки и человека, наиболее предпочтительно человека.

Легенда для фигур

Фиг. 1 – Схематическое представление термочувствительной липосомы (TSL), образованной бислоем мембраны из амфифильных фосфолипидных вспомогательных веществ, инкапсулирующих активный фармацевтический ингредиент (АФИ).

5 **Фиг. 2** – Схематическое представление крупномасштабного процесса производства партий DPPG₂-TSL_{30%}-DOX. В принципе, также применимо для инкапсуляции других активных фармацевтических ингредиентов после подгонки, например, внутрилипосомного буфера, буфера для загрузки, раствора активного фармацевтического ингредиента и параметров процесса.

10 **Фиг. 3** – Эксперименты по динамическому рассеянию света показали, что ζ -потенциал значительно повышался для TSL с ≥ 10 мол. % DPPG₂ из-за адсорбции белка.

Фиг. 4 – ИФА для *in vitro* активации комплемента различных составов термочувствительных липосом (TSL) в плазме крови человека. C3a (A), Bb (B) и SC5b-9 (C) использовали как считывание. Однофакторный дисперсионный анализ критерий Даннета проводили с 5% PEG TSL в качестве набора контрольных данных для определения значительной разницы активации комплемента относительно стандартно используемых составов TSL. Тестировали N = 3 для каждого состава. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

20 **Фиг. 5** - Оптимальное содержание DPPG₂ в DPPC/DSPC/DPPG₂ 80-х:20:х (мольн./мольн.) с х = 10, 20, 30 (мольн. % DPPG₂-TSL). Тестировали N = 4 для каждого состава.

Фиг. 6 – Эффект внутрилипосомного pH в DPPG₂-TSL_{30%}-DOX на (A) *in vitro* зависящее от температуры высвобождение DOX в фетальной телячьей сыворотке (FCS) и (B) разложение липидов при хранении при 2-8°C.

25 **Фиг. 7** - Эффект внутрилипосомного pH в DPPG₂-TSL_{30%}-DOX на *in vitro* зависящее от температуры высвобождение DOX в фетальной телячьей сыворотке (FCS) при хранении составов в виде замороженных (-20°C, A-C) или жидких (2-8°C, D-F) дисперсий.

30 **Фиг. 8** - Эффект мольного отношения АФИ:липид в DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (внутрилипосомальный буфер:сульфат аммония pH 5,4) на (A) размер пузырька (средний z), измеренный согласно DLS, (B) PDI, измеренный согласно DLS, (C) общее содержание липидных вспомогательных веществ (DPPC; DSPC, DPPG₂, без включения площадей пиков связанных с липидами продуктов разложения) согласно HPLC/CAD, (D) общее содержание DOX (без включения площадей пиков связанных с DOX продуктов разложения) согласно HPLC, (E) фоновая флуоресценция как индикатор для утечки DOX (интенсивность фоновой

флуоресценции повышается, когда внутрилипосомный, погашенный DOX высвобождается и разбавляется во внелипосомной среде), и профиль TDR в FCS с высвобождением DOX в течение 5 минут инкубации при (F) 37°C, (G) 38°C, (H) 39°C, (I) 40°C.

Фиг. 9 - Эффект мольного отношения АФИ:липид в DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (внутрилипосомальный буфер:фосфат аммония pH 7,4) на (A) размер пузырька (средний z), измеренный согласно DLS, (B) PDI, измеренный согласно DLS, (C) общее содержание липидных вспомогательных веществ (DPPC; DSPC, DPPG₂, без включения площадей пиков связанных с липидами продуктов разложения) согласно HPLC/CAD, (D) общее содержание DOX (без включения площадей пиков связанных с DOX продуктов разложения) согласно HPLC, (E) фоновая флуоресценция как индикатор для утечки DOX (интенсивность фоновой флуоресценции повышается, когда внутрилипосомный, погашенный DOX высвобождается и разбавляется во внелипосомной среде), и профиль TDR в FCS с высвобождением DOX в течение 5 минут инкубации при (F) 37°C, (G) 38°C, (H) 39°C, (I) 40°C.

Фиг. 10 – Представление изображений сгуо-ТЕМ для DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, загруженного DOX с использованием буфера на основе фосфата аммония pH 7,4. Размер пузырька (DLS) составлял 118,2 нм (PDI 0,120). Сгуо-ТЕМ проводили с помощью микроскопа в режиме с низкой дозой Titan EFTEM сгуо 300 кВ. Время блота: 4 с, положение блота: -3, решетки: Quantifoil 2/2, температура: 22°C.

Фиг. 11 - Эффект размера пузырька и мольного отношения АФИ:липид для DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (внутрилипосомальный буфер:фосфат аммония pH 7,4) на (A) общее содержание липидных вспомогательных веществ (DPPC; DSPC, DPPG₂, без включения площадей пиков связанных с липидами продуктов разложения) согласно HPLC/CAD, (B) общее содержание DOX (без включения площадей пиков связанных с DOX продуктов разложения) согласно HPLC, (C) фоновая флуоресценция как индикатор для утечки DOX (интенсивность фоновой флуоресценции повышается, когда внутрилипосомный, погашенный DOX высвобождается и разбавляется во внелипосомной среде), и профиль TDR в FCS с высвобождением DOX в течение 5 минут инкубации при (D) 38°C.

Фиг. 12 – Эффект внелипосомной соли и концентрации криопротектора на стабильность при хранении DPPG₂-TSL_{30%}-DOX в виде жидкой дисперсии: (A) эффект размера пузырька (средний z), (B) эффект на фоновую флуоресценцию как индикатор для утечки DOX (интенсивность фоновой флуоресценции повышается, когда внутрилипосомный, погашенный DOX высвобождается и разбавляется во внелипосомной среде). Стабильность при замораживании и оттаивании DPPG₂-TSL_{30%}-DOX: Эффект до 6 циклов замораживания

и оттаивания (FTC) на (C) размер пузырька (средний z), и (D) фоновую флуоресценцию как индикатор для утечки DOX.

Фиг. 13 – Исследование терапевтической эффективности на серых крысах, которым имплантировали подкожно фрагмент ткани саркомы BN175 на левую заднюю конечность.

5 Как только опухоль довели до НТ (т.е. 41°C) путем нагревания лампой, 0,9% солевого раствора (A), нелипосомный DOX (2 мг/кг; B) или партию DPPG₂-TSL_{30%}-DOX 1 (2 мг/кг; C) вводили внутривенно посредством катетера в хвостовой вене и нагревание поддерживали в течение еще часа после этого. График Каплана-Мейера на основе времени утروения объема опухоли показал значительную разницу в задержке роста опухоли между животными, которых лечили солевым раствором (0,9%), нелипосомным DOX и DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 1 (D). Данные представляли $n=6$ на группу. Однофакторный ANOVA тест Тьюки проводили для определения разницы между группами лечения.

Фиг. 14 – Схема инъектирования крыс для исследования фармакокинетики (PK) и ускоренного клиренса из крови (ABC) загруженных карбоксифлюоресцеином (CF) термочувствительных липосом (TSL). В 0 день крысам инъектировали состав выбора с дозой липидов 5 или 75 мкмоль/кг, а затем прямой эксперимент PK после этого или PK следовал сразу после второго введения через указанные 7, 14, 21 или 28 дней.

Фиг. 15 – Фармакокинетика (PK) и ускоренный клиренс из крови карбоксифлюоресцеина (CF), составленного в TSL0 (A), 5%PEG TSL (B, E), 10%PEG TSL (C) и 30% DPPG₂ TSL (D, F), у серых крыс. В первом наборе экспериментов (A-C) использовали дозу липидов 5 мкмоль/кг. Во втором наборе экспериментов (D-F) использовали дозу липидов 75 мкмоль/кг. PK проводили сразу же после первого введения (●), или сразу же после второй дозы через указанные 7 дней (■), 14 дней (◆), 21 день (○) или 28 дней (▽) после первой дозы. Крысам на конечных графиках (G и H) давали первую дозу в 75 мкмоль/кг 5% PEG TSL (G) или 30% DPPG₂ TSL (H), с последующим немедленным экспериментом на PK (●). Другие наборы данных на этих графиках показывают PK CF, когда крысы получали такой же состав и дозу (■) или 5 мкмоль/кг 5% PEG TSL (◆) за 7 дней до эксперимента на PK. Линейные или неэкспоненциальные кривые затухания устанавливали для определения значений периода полураспада CF (таблица 2). $N=3$ на группу.

Ссылки

[1] M.B. Yatvin, J.N. Weinstein, W.H. Dennis, R. Blumenthal, Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia, *Science* 202 (1978) 1290–1293.

5 [2] D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, M.W. Dewhirst, A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model, *Cancer Res* 60 (2000) 1197–1201.

[3] L.H. Lindner, M.E. Eichhorn, H. Eibl, N. Teichert, M. Schmitt-Sody, R.D. Issels, M. Dellian, Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time, *Clin Cancer Res* 10 (2004) 2168–2178. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0035>.

10 [4] M. Hossann, M. Wiggenhorn, A. Schwerdt, K. Wachholz, N. Teichert, H. Eibl, R.D. Issels, L.H. Lindner, In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1768 (2007) 2491-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.021>

15 [5] S. Limmer, J. Hahn, R. Schmidt, K. Wachholz, A. Zengerle, K. Lechner, H. Eibl, R.D. Issels, M. Hossann, L.H. Lindner, Gemcitabine treatment of rat soft tissue sarcoma with phosphatidylidiglycerol-based thermosensitive liposomes, *Pharm Res* 31 (2014) 2276-86. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1322-6>

20 [6] L. Willerding, S. Limmer, M. Hossann, A. Zengerle, K. Wachholz, T.L.M. ten Hagen, G.A. Koning, R. Sroka, L.H. Lindner, M. Peller, Method of hyperthermia and tumor size influence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors, *Journal of Controlled Release* 222 (2016) 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.004>.

Примеры

Следующие примеры предложены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения никоим образом.

Пример 1: Получение липосом и определение биофизических характеристик

- 5 Термочувствительные липосомы и их композиции, также называемые термочувствительными (TSL) составами, можно получать путем особых способов получения (например, гидратация липидной пленки и процесс экструзии, введение этанола или другие способы). Активный фармацевтический ингредиент загружается или
- 10 пассивным, или активным процессом. Загрузка с активным удалением может достигаться с помощью, например, градиента аммония, градиента кислоты или градиента соли EDTA.

Таблица 1 – Примеры для буферов и растворов активных фармацевтических ингредиентов, используемые для получения отдельных препаратов DPPG₂-TSL

АФИ	Метод загрузки	Внутрилипосомальный буфер	Буфер для загрузки	Раствор АФИ	Буфер для хранения
HBS pH 7,4	Пассивный	HBS pH 7,4	Не нужен	Не применимо	HBS pH 7,4
CF	Пассивный	100 mM CF pH 7,2	Не нужен	См. внутрилипосомальный буфер	HBS pH 7,4 или 0,9% солевой раствор
DOX (цитрат)	Активный	300 mM лимонной кислоты pH 4	HBS pH 7,4	5,7 мг/мл доксорубицина HCl	HBS pH 7,4
DOX (сульфат аммония)	Активный	240 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 5,4	HBS pH 7,4 или PBS pH 7,4	5,7 мг/мл доксорубицина HCl	10% (вес./об.) трегалозы, 10,5 mM фосфата Na/K

DOX (фосфат аммония)	Активный	300 мМ (NH ₄) ₂ HPO ₄ pH 7,4	HBS pH 7,4 или PBS pH 7,4	5,7 мг/мл доксорубицина HCl	10% (вес./об.) трегалозы, 10,5 мМ фосфата Na/K
CPT-11	Активный	300 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7,4	HBS pH 7,8	20 мг/мл Иринотекан HCl	HBS pH 7,4
dFdC	Пассивный, равновесный метод	HBS pH 7,4	HBS pH 7,4	38 мг/мл dFdC, pH 3 или pH 6 (отрегулированный путем добавления 600 мМ NaHCO ₃)	HBS pH 7,4

Маломасштабные способы получения для DPPG₂-TSL с инкапсулированным CF или DOX относятся к уровню техники. Вкратце, все растворы получали с деионизированной и очищенной водой из ультрачистой водной системы (Milli Q Advantage, Millipore) и затем

5 фильтровали через 0,2 мкм перед использованием. Фосфолипиды в требуемом мольном отношении (например, DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 для DPPG₂-TSL_{30%}) растворяли в хлороформе/метаноле 9:1 (об./об.) в круглодонной колбе. Растворитель испаряли под вакуумом в роторном испарителе до образования тонкой и однородной липидной пленки. Липидную пленку сушили в течение по меньшей мере 1 часа при 10 мбар/70°C для удаления

10 оставшихся следов органического растворителя. Гидратацию пленки проводили с помощью предназначенного внутрилипосомного буфера/раствора АФИ (таблица 1) при 60 °C в течение 30 минут при встряхивании. Полученная концентрация липидов составляла 50 мМ. Однослойные пузырьки получали 10-кратной экструзией при 60°C с давлением N₂ максимум 20 бар через два поликарбонатных фильтра с желаемым размером частиц

15 (например, 200 нм, Whatman, GE Healthcare Europe GmbH, Фрайбург, Германия), используя экструдер с термобарабаном (LIPLEXTM, Northern Lipids Inc. Бернаби, Британская Колумбия, Канада). Затем дисперсию охлаждали до 2-8°C и буфер обменивали на буфер для загрузки (таблица 1, если активное лекарственное средство или равновесная загрузка проводились) или буфер для хранения (таблица 1, если проводилась пассивная загрузка), применяя

20 колонки PD10 (GE Healthcare). Если АФИ загружали с помощью активного или

равновесного метода, следующие этапы проводили. Требуемые условия загрузки (например, молярное соотношение лекарственного средства/липида и концентрация фосфолипидов) получали путем смешивания дисперсии липосом с буфером для загрузки и раствором АФИ (таблица 1). Дисперсию нагревали при встряхивании (например, до 37°C в течение 60 минут для DOX, до 37°C в течение 45 минут для CPT-11, до 60°C в течение 30 минут для dFdC) в Eppendorf Thermomixer comfort с 50 мл термоблоком. Следы неинкапсулированного АФИ удаляли центрифугированием при 75000 xg (Beckman Coulter Avanti J-26 XP с ротором JA-25.50). Супернатант отбрасывали и пеллету аккуратно повторно суспендировали с буфером для хранения (таблица 1).

Для крупномасштабного получения DPPG₂-TSL адаптированный способ применяли, используя подходящее оборудование для работы с большими объемами дисперсии, тогда как стандартные этапы получения не изменялись. Примененный процесс схематически показан на фиг. 2. В отличие от маломасштабного процесса, липосомы получались путем введения этанола, а не гидратации липидной пленки, и обмен буферов проводили с помощью проточной фильтрации вдоль потока (TFF), а не хроматографии или центрифугирования, соответственно.

Определение характеристик препаратов TSL известно в данной области. Гидродинамический диаметр (средний z), график размер распределения интенсивности размеров и дзета-потенциал определяли по динамическому рассеянию света (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Вустершир, Великобритания). Прибор калибровали с помощью размерного стандарта Nanosphere™ (125 нм, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Композицию фосфолипидов количественно определяли с помощью ТСХ. Пластины для ТСХ обрабатывали хлороформом/метанолом/уксусной кислотой (97,5%)/водой 100/60/10/5 (об./об.) для достижения отделения фосфатидилхолинов (DPPC, DSPC) от DPPG₂, лизофосфатидилхолина (Lyso-PC) и лизофосфатидилдиглицерина (Lyso-PG₂). Липидный стандарт, содержащий DPPG₂, DPPC и 1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (P-Lyso-PC), применяли в каждом цикле ТСХ для проверки качества разделения. Концентрацию фосфолипидов измеряли анализом фосфатов, используя 1 г/л раствора фосфата (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) в качестве эталонного стандарта. In vitro зависящее от температуры высвобождение АФИ (TDR) анализировали в фетальной телячьей сыворотке (FCS), как описано ранее.

Чистоту и концентрацию DOX, CPT-11, dFdC и липидных вспомогательных веществ количественно определяли с помощью ВЭЖХ. Свободные жирные кислоты количественно определяли с помощью метода с конечной точкой ферментации с помощью набора NEFA

от DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Хольцхайм, Германия) согласно их стандартному протоколу.

Пример 2: Увеличение содержания DPPG₂ в TSL снижает активацию комплемента

Исследованные составы TSL

5 Множество составов TSL, отличающихся по липидному составу, были описаны на данный момент, но неясно, который может быть наиболее оптимальным в клинической ситуации. Достаточное время полураспада в кровотоке TSL при HT-обработке является только одним важным фактором для оптимальной доставки лекарственных средств к солидным опухолям. Очень важно, что эти составы могут вводиться внутривенно

10 пациентам без тяжелой токсичности, как у CARPA. Эти реакции гиперчувствительности могут иметь серьезные осложнения при инфузии частиц, что может требовать вмешательства или профилактического приема лекарств. Таким образом, несколько составов TSL получали для исследования эффекта DSPE-PEG2000 и DPPG₂ на активацию комплемента. Липидные композиции представляли собой DPPC/DSPC/DSPE-PEG2000

15 80:20-х:х (мольн./мольн.) х = 5, 10, 20, 30 (PEG-TSL_{х%}) и DPPC/DSPC/DPPG₂ 80-х:20:х (мольн./мольн.) х = 5, 10, 20, 30 (DPPG₂-TSL_{х%}). Состав TSL без поверхностной модификации, состоящий из DPPC/DSPC 80:20 (мольн./мольн.) (TSL_{0%}), служил в качестве контроля. PEG-TSL_{20%} и PEG-TSL_{30%} не показали соответствующей стабильности дисперсии и исключались из исследования. Размер пузырьков составлял от 100 до 150 нм с

20 PDI < 0,10 для всех остальных PEG-TSL и DPPG₂-TSL. DPPG₂-TSL имел отрицательный поверхностный заряд, что становился более преобладающим с увеличением мол. % DPPG₂ (фиг. 3С).

Активация комплемента

Активацию комплемента составами TSL оценивали с помощью наборов для ELISA C3a, Bb и SC5b-9 (Quidel, Сан-Диего, Калифорния) на инкубированной с TSL плазме крови человека. 15 мкл TSL (25 мМ) с инкапсулированным HBS pH 7,4 добавляли в 135 мкл плазмы крови человека, антикоагулированную цитратом, и инкубировали при 37°C, 750 об/мин в течение 30 минут в термошейкере. Инкубацию заканчивали разбавлением образцов в разбавителе для образца C3a, Bb или SC5b-9, поставляемом в соответствующих

30 наборах. Образцы загружали в лунки ELISA и анализ проводили по инструкциям изготовителя. 15 мкл 10 мг/мл зимозана А в 0,9% солевом растворе использовали в качестве положительного контроля для анализа. После инкубации сыворотки с зимозаном образец центрифугировали при 800 x g в течение 10 минут и супернатант разбавляли в разбавителе для образца аналогично тому, что описано выше. Планшеты измеряли на поглощение при

450 нм с помощью ридера для микропланшетов MRX (Dynatech Laboratories, Александрия, Виргиния). TSL_{0%} и PEG-TSL не показали активации комплемента, тогда как инкубация DPPG₂-TSL_{5%} индуцировала значительное повышение уровней C3a, Bb и SC5b-9 (фиг. 4). Повышение мол. % DPPG₂ до 30 мол. % значительно снижало активацию комплемента, индуцированную наночастицами.

Известно, что анионные наночастицы являются сильными активаторами комплемента и, таким образом, могут индуцировать токсичность после внутривенного введения пациентам. Включение больших количеств анионного DPPG₂ в состав TSL, однако, неожиданно снижало активацию комплемента, и это явно отличается от исследований CARPA для других отрицательно заряженных наночастиц, которые описывают противоположное, и приводит к пониманию, что отрицательно заряженные наночастицы следует тщательно исследовать перед клиническим использованием, и что не только отрицательный поверхностный заряд сам по себе, но и также его величина и конкретные характеристики липидной концевой группы играют важную роль в CARPA. Низкая активация комплемента в плазме крови человека для DPPG₂-TSL_{20%} и DPPG₂-TSL_{30%} является уникальной и может быть показанием того, что эти составы имеют выгодный профиль токсичности относительно других отрицательно заряженных составов, которые в настоящее время используются в клинической практике.

Результаты соответствующего исследования токсичности GLP с DPPG₂-TSL_{30%} (партия 3, таблица 3) на собаках подтверждало *in vitro* обнаружения сниженной активации комплемента. 10 собак (5 самцов/5 самок) получали внутривенные инфузии DPPG₂-TSL_{30%} (5,6 мг DPPG₂ на кг веса тела на дозу) каждые три недели в течение 12 недель. Никаких признаков анафилактических реакций не записывали. Это отличалось от LTSL, где премедикация собак была необходимой для подавления анафилактических реакций.

Пример 3: Содержание DPPG₂ в TSL предотвращает возникновение ускоренного клиренса из крови

Исследованные составы TSL

Получение и композиция исследуемых липосомных составов подытожены в примере 2.

Экспериментальная процедура

Эксперименты по фармакокинетике (ПК) проводили, как описано на фиг. 14. 1 мл загруженной CF TSL вводили через вену полового члена крысам BN при 5 мкмоль/кг или 75 мкмоль/кг дозы липидов. 180 мкл образцы крови собирали в пробирках с цитратом путем надреза хвостовой вены в $t = 0$ мин (перед введением TSL), 10 мин, 20 мин, 30 мин, 40 мин, 60 мин, 4 часа и 8 часов и центрифугировали при 1,300 x g в течение 10 мин с получением

плазмы. После экспериментов РК крыс умерщвляли путем внутрисердечной инъекции 300 мг/кг пентобарбитала и для интересующих групп иссекали печень, селезенку и почки и хранили при -20°C для дальнейшего использования. Образцы плазмы анализировали на содержание CF флуорометрией после инкубации в 10% Triton X-100 при 45°C в течение 15 минут для обеспечения полного высвобождения CF. Процент инъецируемой дозы (% ID) в образцах плазмы рассчитывали путем сравнения сигнала от образца с сигналом от 100% образца, который представлял максимальное ожидаемое содержание CF в общем объеме крови крысы, рассчитанном из веса ее тела. Флуоресценцию CF измеряли в 0,9% NaCl/10 mM буфере Tris pH 8,0 (440:80, об.:об.) при 493 нм возбуждении и 513 нм излучении.

10 Ускоренный клиренс из крови

Различные опубликованные исследования показали, что ответы антитела на PEG (антитело IgM к PEG) после первого введения PEGилированных липосом могут сильно снижать фармакокинетический профиль следующего введения, явление, которое описано как ускоренный клиренс из крови (ABC).

15 Измерения CF в плазме крыс, которым вводили TSL0, показали, что отсутствие поверхностной модификации вызывает незначительно время циркуляции инкапсулированного флуорофора с периодом полураспада в кровотоке ($t_{1/2}$) в несколько минут (фиг. 15A; таблица 2). CF, инкапсулированный в 5% PEG TSL и 10% PEG TSL, имел значительно более длинное $t_{1/2}$ с 332 ± 124 мин и 155 ± 44 мин, соответственно (фиг. 15B и 20 15C; таблица 3). Однако, если дополнительное введение пэгилированной TSL предшествовало эксперименту на РК на 7-28 дней, $t_{1/2}$ CF снижалось на менее чем 10 минут, и это удерживалось в течение всего периода в 28 дней. Наши обнаружения показали, что эффект ABC является очень эффективным и устойчивым в отрицательном влиянии на профиль РК для составов PEGилированных TSL, даже если уровни антитела IgM к PEG 25 низкие. Поверхностное покрытие DPPG₂ доказывало меньшую эффективность, чем PEG, в отношении улучшения $t_{1/2}$ CF, поскольку TSL с 30% DPPG₂ имели $t_{1/2}$ CF 29 ± 31 минут (фиг. 15D; таблица 2). Однако $t_{1/2}$ CF не изменялось из-за раннего введения TSL с 30% DPPG₂. Когда такой же эксперимент повторяли при дозе липидов 75 мкмоль/кг, $t_{1/2}$ CF повышалось для с TSL 5% PEG и TSL с 30% DPPG₂ до 611 ± 93 минут и 138 ± 76 минут, 30 соответственно (фиг. 15E и 15F; таблица 2). $t_{1/2}$ CF не изменялось для TSL с 30% DPPG₂, если предварительно дозировали такой же состав при 75 мкмоль/кг, что было подобным наблюдением, что и ранее упомянутые результаты при 5 мкмоль/кг. Напротив, повышение дозы сильно снижало эффект ABC для TSL с 5% PEG. Если крысам сначала давали инъекцию 5 мкмоль/кг TSL с 5% PEG, с последующим экспериментом на РК через одну

неделю после с 75 мкмоль/кг TSL с 5% PEG или TSL с 30% DPPG₂, $t_{1/2}$ CF составляли 41 ± 53 мин и 174 ± 53 мин, соответственно (фиг. 15G и 15H; таблица 2). Обратная корреляция между дозой липосомы и ABC известна для циркулирующих долго липосом с очень высокой стабильностью мембраны. Для составов TSL, однако, утечка лекарственного средства, вероятно, является наиболее важным фактором для рассмотрения, также когда вводится в более высокой дозе. Как ранее описано в данном разделе, даже относительно низкое количество антитела IgM к PEG может быть особенно успешным в дестабилизации мембраны TSL и сильно снижает $t_{1/2}$ инкапсулированного соединения.

Таблица 2. Время полураспада в кровотоке карбоксифлуоресцеина, инкапсулированного в различных составах TSL

	$t_{1/2}$ 0 день (мин)	$t_{1/2}$ 7 день (мин)	$t_{1/2}$ 14 день (мин)	$t_{1/2}$ 21 день (мин)	$t_{1/2}$ 28 день (мин)
TSL0 (5 мкмоль/кг)	3±1	2±0	2±0	2±0	2±1
TSL с 5% PEG (5 мкмоль/кг)	332±124	3±0	3±0	6±2	8±8
TSL с 5% PEG (10 мкмоль/кг)	155±44	3±1	3±1	7±3	7±3
TSL с 30% PG ₂ (5 мкмоль/кг)	29±31	53±31	52±46	21±23	42±57
TSL с 5% PEG (75 мкмоль/кг)	611±93	412±13	602±7	486±43	537±50
TSL с 30% DPPG ₂ (75 мкмоль/кг)	138±76	106±91	147±69	134±57	120±39
5 (5% PEG) – 75 (5% PEG)		41±53			
5 (5% PEG) – 75 (30% DPPG ₂)		174±53			

Таким образом, дополнительные исследования РК на крысах проводили с PEG-TSL_{5%}, PEG-TSL_{10%} или DPPG₂-TSL_{30%} с инкапсулированным CF для оценки параметров РК. PEG-TSL показал ABC, как сообщается в уровне техники, тогда как введение DPPG₂-TSL_{30%} крысам не показало ABC. Поскольку отсутствие ABC для наночастиц, покрытых полиглицериновыми фрагментами, было показано ранее, резонно предположить, что покрытие олигоглицеринами, такими как, например, DPPG₂, также предотвращает ABC. Другим важным фактором, который следует принимать во внимание, является присутствие антител к PEG у ранее не лечившихся пациентов из-за частого воздействия PEG в обычно используемых продуктах, что может уже ухудшать первый цикл лечения пэгилированной TSL. По этим причинам клинически релевантно исследовать составы TSL, которые не используют ПЕГилирование, таким образом делая DPPG₂-TSL интересным кандидатом для клинической разработки.

Заключение

Результаты примера 2 показали, что известная активация комплемента анионных наночастиц может подавляться с помощью > 10 мол. % DPPG₂ в составах TSL. Как показано в примере 2 и примере 3, вместе с более длительным временем полураспада в кровотоке отсутствие явления ABC после повторной инъекции и отсутствие признаков анафилактической реакции у собак квалифицирует содержащие АФИ DPPG₂-TSL в качестве перспективного кандидата для доклинической разработки.

В заключение, привлекательные результаты получали для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где концентрация DPPG₂ в бислое составляет по меньшей мере 15 мол. %. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где концентрация DPPG₂ в бислое составляет от 15 мол. % до 35 мол. %.

Пример 4: Увеличение содержания DPPG₂ в TSL приводит к превосходному накоплению АФИ в сайте-мишени

Оптимальное содержание DPPG₂ в DPPC/DSPC/DPPG₂ 80-х:20:х (мольн./мольн.) с х = 10, 20, 30 (DPPG₂-TSL_{х%}) для достижения терапевтической эффективности исследовали путем биораспределения (BD) и исследования обогащения опухоли доксорубицином (DOX) на серых крысах. Содержание DSPC устанавливали на 20 мол. % во всех партиях для достижения сравнимого состава жирных кислот в мембране TSL как пальмитиновая кислота к стеариновой кислоте 80:20 (мольн./мольн.). Три независимых состава DPPG₂-TSL, отличающихся содержанием DPPG₂ (10, 20, 30 мол. %), получали с помощью 300 мМ цитрата pH 4 для активной загрузки DOX. Среднее Z составляло 125,1 нм, 120,5 нм и 114,8

нм для DPPG₂-TSL_{10%}, DPPG₂-TSL_{20%} и DPPG₂-TSL_{30%}, соответственно. PDI составлял < 0,07 для всех трех партий. Как следует ожидать исходя из содержания DPPG₂, дзета-потенциал снижался с -13,6 мВ для DPPG₂-TSL_{10%}, -22,7 мВ для DPPG₂-TSL_{20%}, до -31,1 мВ для DPPG₂-TSL_{30%}. Содержание лизолипидов составляло ~1 мол. % для каждой партии, показывая сравнимое разложение липосом при производстве. Конечное молярное соотношение DOX:липид составляло 0,094, 0,104 и 0,106 для DPPG₂-TSL_{10%}, DPPG₂-TSL_{20%} и DPPG₂-TSL_{30%}, соответственно. In vitro высвобождение DOX в FCS в течение 5 минут при 41°C повышалось с повышением содержания DPPG₂: 16,8%, 63,7% 93,2% для DPPG₂-TSL_{10%}, DPPG₂-TSL_{20%} и DPPG₂-TSL_{30%}, соответственно. Это наблюдение согласуется с опубликованным эффектом DPPG₂ в отношении скорости высвобождения содержимого. Профиль РК у серых крыс в первые 60 минут был сравним для всех трех составов, показывая моноэкспоненциальный клиренс, как известно из уровня техники (WO9730058, WO2014202680). Затем проводили исследование BD у крыс с опухолью BN175, принимающих 2 мг/кг DOX внутривенно в комбинации с 60 минутами гипертермии (HT) опухоли под лампой (фиг. 5). Объемы опухолей составляли ~1 см³. DPPG₂-TSL_{x%} вводили внутривенно в хвостовую вену после достижения целевой температуры 41°C в опухоли. В конце HT образец крови отбирали сердечной пункцией перед умерщвлением животных. После сердечной перфузии собирали образцы тканей. Содержание DOX количественно определяли с помощью ВЭЖХ. DPPG₂-TSL_{20%} и DPPG₂-TSL_{30%} достигали заметно большего осаждения лекарственного средства в опухоли, чем DPPG₂-TSL_{10%}. Не было разницы в содержании DOX в других тканях за исключением селезенки, где содержание DOX было выше для DPPG₂-TSL_{10%}.

Заключение: Результаты показывают, что ни свойства длительной циркуляции носителя (как сообщается, например, в WO02064116 для, например, DPPG₂-TSL_{10%}) отдельно, ни только in vitro свойства высвобождения лекарственного средства не являются решающими для определения оптимального липидного состава DPPG₂-TSL, который достигает наибольших концентраций лекарственных средств путем активированного теплом высвобождения АФИ в нагретых опухолях in vivo. Результаты BD показывают, что даже более медленное высвобождение DPPG₂-TSL_{20%} достигает сравнимых уровней DOX, что и DPPG₂-TSL_{30%}. Длительно циркулирующий DPPG₂-TSL_{10%} показал значительно меньшее накопление АФИ на сайте-мишени.

В заключение, привлекательные результаты получали для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где концентрация DPPG₂ в бислое составляет по меньшей мере 15 мол. %. Еще более привлекательные результаты получали для

термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где концентрация DPPG₂ в бислое составляет от 15 мол. % до 35 мол. %.

Пример 5: Внутрелипосомный pH влияет на фосфолипидное вспомогательное вещество и стабильность АФИ DPPG₂-TSL-API

Оценивали эффект pH внутрелипосомного буфера на фосфолипидное вспомогательное вещество и стабильность АФИ DPPG₂-TSL-АФИ.

DPPG₂-TSL_{30%}-DOX получали согласно мелкомасштабному способу, описанному в примере 1, отличающемуся значением pH внутрелипосомного буфера, используемого для активной загрузки АФИ (лимонная кислота pH 4, сульфат аммония pH 5,4 и фосфат аммония pH 7,4). Составы хранили при условиях жидкости (2-8°C) и заморозки (-20°C) и биофизические характеристики тестировали периодически. Внутрелипосомный pH не показал эффекта на профиль TDR для свежеприготовленного DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (фиг. 6A). При хранении в жидком состоянии при 2-8°C DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, используя внутрелипосомальный буфер pH 4, показал быстрое разложение липидного вспомогательного вещества с более чем 5% лизофосфатидилхолинов, присутствующих через 37 дней (фиг. 6B). В отличие от содержащих холестерин липосом, где до 15% продуктов разложения липидов не имеют отрицательного влияния на проницаемость мембраны, даже меньшие количества лизофосфатидилхолинов (до ~5%, фиг. 6B) имели заметное отрицательное влияние на TDR, с ухудшенным удержанием АФИ при 37°C и заметно повышенным высвобождением АФИ при температурах $\geq 38^\circ\text{C}$ с каждым днем хранения при 2-8°C (фиг. 7D). DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, используя внутрелипосомальный буфер pH 5,4, показали менее быстрое разложение, но скорость гидролиза повышалась через 14 дней и давала более чем 5% лизофосфатидилхолинов через 98 дней (фиг. 6B). Профиль TDR оставался постоянным в течение по меньшей мере 14 дней хранения при 2-8°C, но затем изменялся (фиг. 7E). DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, используя внутрелипосомальный буфер pH 7,4, был наиболее стабильным составом с обнаружимым содержанием лизофосфатидилхолинов через 42 дней хранения (фиг. 6B). Профиль TDR оставался постоянным в течение по меньшей мере 14 дней хранения при 2-8°C, но затем изменялся (фиг. 7D). Изменение в профиле TDR было менее заметным по сравнению с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, используя внутрелипосомальный буфер pH 5,4.

Получение DPPG₂-TSL_{30%}-DOX с внутрелипосомным буфером со значением pH от 6,4 до 7,4 не имело влияния на стабильность составов TSL (данные не показаны).

Значение pH внутрелипосомных буферов также тестировали для DPPG₂-TSL_{30%}-dFdC. Путем регулирования pH раствора dFdC на уровне 6-6,5 перед загрузкой никаких

лизолипидов не обнаруживали после получения партий. Изменение pH также приводило к изменению профиля TDR, с меньшим высвобождением при 41°C и 42°C ($22,3 \pm 10,5\%$ при 42°C для состава с pH 6 по сравнению с $45,9 \pm 17,6\%$ для состава с pH 3). Изменение pH давало состав с возможностью хранения при 2-8°C, тогда как опубликованный состав следовало хранить при -20°C. Состав с pH 3 показал уже более чем 10% продуктов разложения липидов через 12 недель хранения при 2-8°C ($28,16 \pm 1,95\%$ свободных жирных кислот и $14,1 \pm 5,1\%$ лизолипидов), тогда как для состава с pH 6 никакого изменения не наблюдали в анализируемые 24 недели. Утечка АФИ при хранении также повышалась уже через 12 недель для состава с pH 3, тогда как никакой утечки не обнаруживали для состава с pH 6.

Заключение: Внутрилипосомный pH в диапазоне от 4 до 7,4 не влиял на TDR DPPG₂-TSL_{30%}, но значительно влиял на стабильность липидного вспомогательного вещества и TDR при хранении. С увеличением количеств связанных с липидами примесей профиль TDR изменяется и, таким образом, состав больше нельзя использовать в лечении пациентов.

Применение внутрилипосомного pH в диапазоне от 5,4 до 7,4 обеспечивало стабильность фосфолипидов в течение по меньшей мере 1 недели в виде жидкости для обеспечения отсутствия отрицательного эффекта на TDR при производстве. Использование внутрилипосомного pH в диапазоне от 6,0 до 7,4 обеспечивало стабильность фосфолипидов в течение по меньшей мере 4 недель в виде жидкости для обеспечения отсутствия отрицательного эффекта на TDR при производстве.

В заключение, получали привлекательные результаты для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 5,0 до 8,0. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 6,0 до 8,0.

Пример 6: Концентрация соли в буфере для загрузки ускоряет загрузку АФИ

Ускоренные температуры на отдельных этапах процесса производства могут давать разложение липидных вспомогательных веществ или АФИ. Поскольку загрузку АФИ в DPPG₂-TSL проводили при 38°C для DOX или 60°C для dFdC, оценивали влияние времени инкубации и концентрации соли в буфере для загрузки.

DPPG₂-TSL_{30%} получали согласно крупномасштабному способу, описанному в примере 1. Фосфат аммония pH 7,4 использовали как внутрилипосомальный буфер при производстве липосом. Буфер обменивали на отдельные буферы для загрузки, отличающиеся концентрацией соли. Буфер А: физиологический PBS pH 7,4 без трегалозы

(300 мОсмоль/кг). Буфер В: 4,1% (вес./об.) трегалозы, 10,5 мМ фосфата Na/K, 66 мМ солевого раствора (294 мОсмоль/кг). Буфер С: 8,9% (вес./об.) трегалозы, 10,5 мМ фосфата Na/K, 66 мМ солевого раствора (294 мОсмоль/кг). Загрузку DOX проводили с назначенным мольным отношением АФИ:липид 0,08 при 37-38°C. За загрузкой DOX следовала флуоресцентная спектроскопия. В отдельные моменты времени 20 мкл образцы разводили с помощью 3 мл HBS pH 7,4. После того как интенсивность флуоресценции образца составляет $\leq 20\%$ исходной интенсивности флуоресценции без инкубации и остается постоянной, загрузку завершают. Загрузку в буфер А, буфер В и буфер С заканчивали через 20 мин, 45 мин и 90 мин, соответственно, что показывает, что загрузку АФИ можно проводить в физиологических буферах, содержащих высокие концентрации соли и не содержащих криопротектор.

Затем DPPG₂-TSL_{30%} получали согласно крупномасштабному способу, описанному в примере 1. Фосфат аммония pH 7,4 использовали как внутрилипосомальный буфер при производстве липосомы, и буфер А использовали как буфер для загрузки. Загрузку DOX проводили с назначенным мольным отношением АФИ:липид 0,08 при 37-38°C в течение 30 минут и 90 минут. Общее содержание связанных с АФИ примесей в партии зависит от времени инкубации, с $<0,10\%$ площади и 4,1% площади в течение 30 минут и 90 минут, соответственно. Общее содержание примесей, связанных с липидами, в партии также зависит от времени инкубации, с $<0,10\%$ площади и 0,13% площади в течение 30 минут и 90 минут, соответственно.

В заключение, получали привлекательные результаты для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где указанные термочувствительные липосомы получали с помощью буфера для загрузки с концентрацией соли по меньшей мере 66 мМ и осмолярностью по меньшей мере 250 мОсмоль/кг. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, где указанные термочувствительные липосомы получали с помощью буфера для загрузки с концентрацией соли по меньшей мере 66 мМ и осмолярностью от 250 мОсмоль/кг до 350 мОсмоль/кг.

Пример 7: Отношение АФИ:липид влияет на стабильность DPPG₂-TSL-АФИ

DPPG₂-TSL_{30%}-DOX получали согласно крупномасштабному способу, описанному в примере 1, отличающемуся мольным отношением АФИ:липид от 0,06 до 0,13. Или сульфат аммония pH 5,4, или фосфат аммония pH 7,4 использовали как внутрилипосомальный буфер, соответственно. После получения партии хранили при $5\pm 3^\circ\text{C}$ в течение до 15 недель и проводили определение биофизических характеристик, исследуя размер пузырьков, PDI,

общее содержание липидных вспомогательных веществ (DPPC, DSPC, DPPG₂, без включения площадей пиков связанных с липидами продуктов разложения) согласно HPLC/CAD, общего DOX (без включения площадей пиков связанных с DOX продуктов разложения) согласно HPLC, фоновую флуоресценцию как индикатор для утечки DOX и профиль TDR в FCS.

Партии DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (сульфат аммония, pH 5,4) показали сравнимое изменение аналитических характеристик, когда молярное соотношение АФИ:липид составляло $\leq 0,10$ (фиг. 8). Напротив, молярное соотношение АФИ:липид 0,13 давало сниженную способность к хранению, видимую в заметном повышении размера пузырьков (фиг. 8A), PDI (фиг. 8B), стабильности носителя в FCS (высвобождение DOX при 37°C, фиг. 8F), и также неожиданно намного более быстром разложении АФИ (фиг. 8D) через 2 недели при $5\pm 3^\circ\text{C}$. Не было обнаружимых различий в разложении липидов (фиг. 8C) и утечке АФИ (фиг. 8E).

Партии DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (фосфат аммония, pH 7,4) показали сравнимое изменение аналитических характеристик, когда молярное соотношение АФИ:липид составляло $\leq 0,09$ (фиг. 9). Напротив, молярное соотношение АФИ:липид 0,13 давало сниженную способность к хранению, видимую в заметном повышении размера пузырьков (фиг. 9A), PDI (фиг. 9B), стабильности носителя в FCS (высвобождение DOX при 37°C, фиг. 9F), и также неожиданно намного более быстром разложении АФИ (фиг. 9D) через 2 недели при $5\pm 3^\circ\text{C}$. Не было обнаружимых различий в разложении липидов (фиг. 9C) и утечке АФИ (фиг. 9E). Тенденция к дестабилизации наблюдалась для партии с мольным отношением АФИ:липид 0,10.

При сравнении партий DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (фосфат аммония, pH 7,4) с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (сульфат аммония, pH 5,4) с мольным отношением АФИ:липид от 0,06 до 0,10, последний показал более быстрое разложение фосфолипидных вспомогательных веществ и более медленное разложение АФИ. Общее содержание липидных вспомогательных веществ для партий фосфата аммония и сульфата аммония составляло $94,9 \pm 2,0\%$ и $92,4 \pm 1,0\%$ исходного содержания через 15 недель при $5\pm 3^\circ\text{C}$, соответственно. Общее содержание АФИ для партий фосфата аммония и сульфата аммония составляло $86,1 \pm 2,5\%$ и $91,8 \pm 2,4\%$ исходного содержания через 15 недель при $5\pm 3^\circ\text{C}$, соответственно. Неожиданно эти партии DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (фосфат аммония, pH 7,4) были более склонными к изменению профиля TDR при хранении по сравнению с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (сульфат аммония, pH 5,4) через 4 недели при $5\pm 3^\circ\text{C}$ (фиг. 8 F-H и фиг. 9 F-H), что может быть скорее результатом

присутствия связанных с АФИ примесей из-за разложения АФИ, а не связанных с липидом примесей.

Кроме того, партии анализировали с помощью крио-ТЕМ, показывая образование
кольцеобразных кристаллических структур АФИ, состоящих из волокон, обернутых вокруг
5 бислоя из внутрилипосомных липидных вспомогательных веществ (фиг. 10).

DPPG₂-TSL_{30%}-CPT-11 получали согласно маломасштабному способу, описанному в
примере 1, отличающемуся мольным отношением АФИ:липид 0,078-0,313. Сульфат
аммония pH 7,4 использовали как внутрилипосомальный буфер. После получения
анализировали высвобождение АФИ при 37°C через 1 час. Было показано, что с
10 повышением отношения АФИ:липид высвободившееся количество CPT-11 снижалось.
Пороговое молярное соотношение АФИ:липид, чтобы иметь достаточную стабильность
при 37°C, идентифицировали как от 0,174 (мольн./мольн.) до 0,21 (мольн./мольн.), с
высвобождением $23,4 \pm 0,6\%$ и $10,2 \pm 0,2\%$ в FBS, соответственно. Отношения АФИ:липид
выше 0,21 давало не большее улучшение высвобождения при 37°C чем $12,5 \pm 3,5\%$.

15 Партии DPPG₂-TSL_{30%}-CPT-11 с различными отношениями АФИ:липид (0,08-0,21)
получали и хранили до 4 недель при 2-8°C. Лизолипиды, которые являются продуктами
разложения липидов, не обнаруживались. Никакого изменения среднего ζ и PDI, а также
зависящего от температуры высвобождения CPT-11 не обнаруживалось. Для оценки,
подходят ли проанализированные параметры для определения стабильности при хранении,
20 партии дополнительно хранили при к.т. 4,3-5,3% лизолипидов обнаруживали через 3
недели хранения при к.т. При зависящем от температуры высвобождении CPT-11
количество высвободившегося лекарственного средства при 40°C повышалось, указывая на
разложение. Например, для четырехнедельного хранения DPPG₂-TSL_{30%}-CPT-11
(отношение АФИ:липид 0,174) при 2-8°C неизменная величина высвобождения при 40°C в
25 FBS в течение 5 минут составляла $48,9 \pm 2,5\%$. Однако через еще одну неделю хранения при
к.т. высвобождение составляло $69,7 \pm 1,0\%$.

Заключение: Внутрилипосомное отношение АФИ:липид влияет на способность к
хранению DPPG₂-TSL_{30%}. Оптимальное отношение АФИ:липид сильно зависит от
загруженного АФИ. Кроме того, в комбинации с определенным отношением АФИ:липид
30 более нейтральный pH, используемый как внутрилипосомальный буфер, является
предпочтительным, поскольку разложение липидных вспомогательных веществ при 2-8°C
медленнее, чем при более кислотном pH, несмотря на тот факт, что разложение АФИ может
быть несколько быстрее.

В заключение, получали привлекательные результаты для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, содержащей доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного фармацевтического ингредиента, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 5,0 до 8,0, и молярное соотношение между доксорубином, указанным производным доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой солью и липидами, содержащимися в бислое, составляет от 0,06 до 0,10 в течение одной недели, избегая замораживания. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, содержащей доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного фармацевтического ингредиента, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 6,0 до 8,0, и молярное соотношение между доксорубином, указанным производным доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой солью и липидами, содержащимися в бислое, составляет от 0,07 до 0,09 в течение одной недели, избегая замораживания.

В заключение, привлекательные результаты получали для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, содержащей иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного фармацевтического ингредиента, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 5,0 до 8,0, и молярное соотношение между иринотеканом, указанным производным иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой солью и липидами, содержащимися в бислое, составляет по меньшей мере 0,18 в течение одной недели, избегая замораживания. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, содержащей иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль в качестве активного фармацевтического ингредиента, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 5,0 до 8,0, и молярное соотношение между иринотеканом, указанным производным иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой солью и липидами, содержащимися в бислое, составляет по меньшей мере 0,20 в течение одной недели, избегая замораживания.

Пример 8: Размер пузырька влияет на стабильность при длительном хранении DPPG₂-TSL-АФИ

DPPG₂-TSL_{30%}-DOX получали согласно крупномасштабному способу, описанному в примере 1, отличающемуся размером пузырька от 85 нм до 120 нм. DOX загружали с помощью внутрилипосомного буфера на основе фосфата аммония pH 7,4. Два различных

мольных отношения АФИ:липид (0,06 и 0,08) дополнительно тестировали. После получения партии хранили при $5\pm 3^\circ\text{C}$ в течение до 15 недель и проводили определение биофизических характеристик, исследуя размер пузырьков, PDI, общее содержание липидных вспомогательных веществ (DPPC, DSPC, DPPG₂, без включения площадей пиков связанных с липидами продуктов разложения) согласно HPLC/CAD, общего DOX (без включения площадей пиков связанных с DOX продуктов разложения) согласно HPLC, фоновую флуоресценцию как индикатор для утечки DOX и профиль TDR в FCS.

Партии с размером пузырька 85 нм показали недостаточную стабильность дисперсии со значительным повышением полидисперсности через 4 недели хранения, что делает измерения DLS в отношении стабильности для более поздних моментов времени невозможными. Для всех других протестированных размеров пузырьков средний z и PDI повышались только постепенно в течение периода хранения, что показывало достаточную стабильность, если использовались размеры пузырьков ≥ 100 нм. Снижение размера пузырька неожиданно влияло на стабильность АФИ при хранении независимо от мольного отношения АФИ:липид (фиг. 11B). Содержание АФИ в DPPG₂-TSL_{30%}-DOX с размером пузырька 85 нм, 100 нм и 120 нм снижали до 78,2%, 84,1% и 88,3% при хранении 15 недель при $5\pm 3^\circ\text{C}$, соответственно. Для общего содержания липидных вспомогательных веществ увеличение разложения было видимым для 85 нм пузырьков для DPPG₂-TSL_{30%}-DOX с мольным отношением АФИ:липид 0,06 (фиг. 11A). Наименьший DPPG₂-TSL_{30%}-DOX с размером пузырька 85 нм также показал заметную утечку DOX при хранении, что начиналась через 4 и 9 недель для составов с мольным отношением АФИ:липид 0,06 и 0,08 (фиг. 11C), соответственно. Эффект снижения размера пузырька на сниженную способность к хранению DPPG₂-TSL_{30%}-DOX также был обнаруживаемым путем увеличения высвобождения DOX при 38°C в FCS при хранении более 4 недель при $5\pm 3^\circ\text{C}$ (фиг. 11D). В общем, при снижении размера пузырька до среднего $z < 100$ нм, состав склонен к разложению АФИ и липидных вспомогательных веществ, что, в свою очередь, отрицательно влияет на профиль TDR. Известно, что снижение размера пузырька в DPPG₂-TSL_{30%} повышает водообмен через бислои из липидных вспомогательных веществ при температурах $< T_{\text{пл}}$. Это повышенная проницаемость для воды повышала риск для процессов гидролитического разложения в составе. Если АФИ склонен к таким процессам разложения, слишком маленького пузырька DPPG₂-TSL следует избегать. Кроме того, одна связанная с DOX примесь, которая генерируется при длительном хранении при $2-8^\circ\text{C}$ в DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, является сильно липофильной и может, таким образом, быть ответственной за изменение профиля TDR при хранении. Поскольку кристалл DOX

находится в пространственной близости к бислою из липидных вспомогательных веществ (фиг. 10), это может давать аддукты липидного вспомогательного вещества-DOX.

В заключение, получали привлекательные результаты для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, содержащих доксорубицин, производное доксорубицина или его фармацевтически приемлемую соль, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 5,0 до 8,0, где молярное соотношение между доксорубицином, указанным производным доксорубицина или его указанной фармацевтически приемлемой солью и липидами, содержащимися в бислое, составляет от 0,06 до 0,10, где диаметр указанной термочувствительной липосомы составляет от 100 нанометров до 200 нанометров, в течение одной недели избегая замораживания. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительных липосом согласно настоящему изобретению, содержащих доксорубицин, производное доксорубицина или его фармацевтически приемлемую соль, где pH внутрилипосомного буфера составляет от 6,4 до 8,0, где молярное соотношение между доксорубицином, указанным производным доксорубицина или его указанной фармацевтически приемлемой солью и липидами, содержащимися в бислое, составляет от 0,07 до 0,09, где диаметр указанной термочувствительной липосомы составляет от 100 нанометров до 150 нанометров, в течение четырех недель избегая замораживания.

Пример 9: Содержание соли в буфере для хранения влияет на стабильность при длительном хранении DPPG₂-TSL-АФИ

Поскольку DPPG₂-TSL_{30%}-DOX склонен к разложению АФИ при хранении в виде жидкой дисперсии при 2-8°C, решили хранить состав как замороженный лекарственный продукт при -20°C. С этой целью криопротектор добавляли во внелипосомальный буфер для обеспечения множества циклов замораживания и оттаивания (FTC) лекарственного продукта без изменения качества критических характеристик. Дисахариды, такие как, например, трегалоза, являются оптимальными криопротекторами для липосомных составов. Для исследования эффекта дополнительных буферных солей для поддержания значения pH около нейтрального pH отдельный DPPG₂-TSL_{30%}-DOX с размером пузырька ~120 нм и молярным отношением АФИ:липид 0,08 получали согласно крупномасштабному способу, описанному в примере 1.

Снижение концентрации соли в буфере для хранения с физиологической концентрации (140 mM) до ≤ 66 mM, стабилизировало DPPG₂-TSL_{30%}-DOX для хранения при 2-8°C, что давало дисперсию, которая показывала заметно более медленное увеличение размера пузырька (фиг. 12A). Для регулирования осмолярности до физиологической концентрации

неионную трегалозу добавляли в буфер для хранения. Концентрацию буферной соли - фосфата Na/K поддерживали постоянной (10,5 мМ). Также скорость утечки АФИ при хранении постепенно подавлялась, когда концентрация соли снижалась от 240 мМ до 0 мМ (фиг. 12B).

- 5 Для достижения стабильности при замораживании и оттаивании для DPPG₂-TSL_{30%}-DOX необходимо $\geq 8\%$ (вес./об.) трегалозы в буфере для хранения. Буфер для хранения, содержащий 10% (вес./об.) трегалозы и 10,5 мМ фосфата Na/K pH 7,4, давал липосомный состав, который выдерживал 6 FTC без заметного изменения размера пузырька (фиг. 12C) и утечки DOX (фиг. 12D). Помимо трегалозы, также сахарозу успешно тестировали для
- 10 достижения стабильности при замораживании и оттаивании DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (данные не показаны).

В заключение, получали привлекательные результаты для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома растворялась в буфере для хранения с концентрацией соли до 100 мМ и

15 осмолярностью по меньшей мере 300 мОсмоль/кг. Еще более привлекательные результаты получали для термочувствительной липосомы согласно настоящему изобретению, где указанная термочувствительная липосома растворялась в буфере для хранения с концентрацией соли до 20 мМ и осмолярностью по меньшей мере 300 мОсмоль/кг.

Пример 10: Окончательный состав для DPPG₂-TSL_{30%}-DOX

- 20 DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, предназначенную для (до)клинической разработки, получали согласно крупномасштабному способу получения, описанному в примере 1 (фиг. 2). Все растворы получали с деионизированной и очищенной водой из ультрачистой водной системы и затем фильтровали через 0,2 мкм перед использованием. Фосфолипиды в мольном отношении DPPC/DSPC/DPPG₂ 50:20:30 растворяли в этаноле при 60°C. 300 мМ
- 25 буфера на основе фосфата аммония получали в ультрачистой воде, pH доводили до 7,4 фосфорной кислотой и буфер фильтровали через 0,2 мкм перед использованием. PBS буфер получали в ультрачистой воде и pH доводили до 7,4 фосфорной кислотой, при необходимости. PBS буфер также фильтровали через 0,2 мкм перед использованием. Этанольный раствор липидов и буфер на основе фосфата аммония закачивали через два
- 30 нагревательных змеевика (60°C) и потоки соединяли при 60°C с помощью тройника. Затем нагретую до 60°C дисперсию закачивали через нагретую до 60°C экструзионную камеру, оборудованную множеством экструзионных мембран с соответствующим размером пор, для генерирования липосом с размером пузырька в диапазоне от 100 до 150 нм. После экструзии поток закачивали через охлажденный до 5°C охлаждающий змеевик в

охлажденную льдом емкость-сборник. Градиент для активной загрузки DOX генерировали путем обмена внелипосомного буфера на PBS pH 7,4 с TFF. Дисперсию затем фильтровали через 0,2 мкм мембраны для снижения бионагрузки. Требуемое молярное соотношение АФИ:липид 0,08 получали путем смешивания липосомной дисперсии с PBS буфером pH 7,4 и раствором АФИ (5,7 мг/мл DOX HCl в ультрачистой воде). Дисперсию нагревали при перемешивании при 37°C в течение 30 минут в круглодонной колбе, оборудованной колбонагревателем. Затем следы неинкапсулированного DOX удаляли и внелипосомальный буфер заменяли на 10% (вес./об.) трегалозы, 10,5 mM фосфат Na/K с помощью TFF. Наконец дисперсия подвергалась фильтрации в асептических условиях (0,2 мкм). Препараты TSL характеризовали, как описано в примере 1. Поворотную точку рассчитывали путем подгонки профиля TDR с сигмоидальной функцией от 37°C до 43°C. Остаточные растворители измеряли с помощью газовой хроматографии (свободное пространство над продуктом). Кроме того, pH, осмолярность, бактериальный эндотоксин и стерильность измеряли с помощью соответствующих методов из Европейской фармакопеи (EP). Типичные аналитические результаты для независимых произведенных партий показаны в таблице 3.

Таблица 3 – Типичные аналитические результаты партий DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, полученных с помощью крупномасштабного способа получения. Партия 1 и партия 3 показали большие количества связанных с АФИ примесей, поскольку время инкубации при загрузке DOX составляло 120 и 90 минут, а не 30 минут, соответственно. Для партии 4 оптимизированные методы ВЭЖХ с заметно большей специфичностью и селективностью использовали для содержания липидов и DOX, что давало обнаружение большего числа и более высоких уровней примесей. TDRI: общее количество связанных с лекарственным средством примесей, TLRI: общее количество связанных с липидами примесей.

Тест	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4
Целевое количество Концентрация DOX	1 л низкое	1 л высокое	4 л высокое	2,5 л среднее
Идентичность липидов и АФИ (ВЭЖХ)	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Содержание (ВЭЖХ)	3,15	14,8	14,8	14,9

- DPPC (мг/мл)	1,32	6,6	6,4	6,4
- DSPC (мг/мл)	2,10	9,2	10,2	9,8
- DPPG ₂ (мг/мл)	0,36	1,9	1,82	1,3
- Доксорубин (мг/мл)				
TLRI	Не обнаружено	<0,10% площадь/площадь	0,13% вес./вес.	4,4% площадь/площадь
TDMI (%) площадь/площадь)	3,9%	< 0,10%	4,1%	2,9
Остаточный EtOH (ppm вес./вес.)	<500	<500	<500	<300
pH (EP 2.2.3)	7,2	7,4	7,4	7,3
Осмоляльность (EP 2.2.35) (мОсмоль/кг)	499	387	390	402
Размер частиц (нм) Индекс полидисперсности (PDI)	123 0,098	122,4 0,09	121,5 0,081	130 0,10
Поворотная точка (°C)	40,4	40,9	40,2	40,66
Бактериальный эндотоксин (EP 2.6.14)	< 1,00 МЕ/мл	< 0,88 МЕ/мл	< 0,40 МЕ/мл	<0,5 ЕЭ/мл
Стерильность (EP 2.6.1)	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Не тестировали

Результаты 12-месячного исследования стабильности DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 1, хранящейся при 5°C ± 3°C, показали, что стабильность партии зависела от четырех различных материалов флаконов, используемых для хранения дисперсии (стекло, PP, COP

и СОС). Кроме того, то же самое правдиво для DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 1, хранящейся при -20°C ± 5°C. Результаты дополнительно показали, что DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 1 была стабильна в течение 11 недель при хранении при 5°C ± 3°C. После этого момента времени наблюдали разложение DOX, а также небольшое, но стабильное увеличение размера пузырька. Никаких признаков разложения фосфолипидных вспомогательных веществ не наблюдали в течение 12 месяцев хранения.

С DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 3 проводили 18-месячное (-20°C ± 5°C, таблица 4) контролируемое по QA/QC исследование стабильности. Образцы анализировали с помощью таких же методов, как описано выше. DPPG₂-TSL_{30%}-DOX была стабильной в течение по меньшей мере 18 месяцев.

Таблица 4 – Результаты исследования стабильности при хранении с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 3 при условии ICH при -20°C ± 5°C. BF: фоновая флуоресценция, TDRI: общее количество связанных с лекарственным средством примесей, TLRI: общее количество связанных с липидом примесей, TP: точка поворота. ^aРезультат анализа, исключенный по QA/QC из-за отклонения в работе оператора при анализе.

Момент времени (месяцы)	Размер частиц (нм)	PDI	TDRI (% площадь/площадь)	TLRI (% площадь/площадь)	TP (°C)	BF (%)	Стерильность (EP 2.6.1)
0	121,5	0,08	4,1	0,13	40,2	14,5	Стерильный
3	124,4	0,09	- ^a	0,35	40,6	13,4	н.о.
6	125,7	0,07	4,4	0,11	40,7	15,1	Стерильный
9	124,4	0,07	6,8	0,35	40,2	18,6	н.о.
12	124,3	0,09	5,9	0,11	40,6	14,9	н.о.
15	124,6	0,08	4,8	0,24	40,2	20,2	н.о.
18	125,4	0,07	5,0	0,26	40,2	16,9	н.о.

Результаты исследования стабильности при замораживании и оттаивании показали, что DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 1 была стабильной в течение 6 циклов замораживания и оттаивания. Кроме того, разные материалы флаконов также не имели влияния на стабильность лекарственного продукта при замораживании и оттаивании. Исследование

повторяли при контроле для QA/QC с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 4, поскольку способ измерения нелипосомного (свободного) DOX с помощью получения образца на основе SPE был доступен (таблица 5). Партия была стабильна в течение по меньшей мере 3 циклов замораживания и оттаивания. DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 4 дополнительно использовали для измерения стабильности на стенде при комнатной температуре при контроле для QA/QC (таблица 6). Партия была стабильна в течение по меньшей мере 8 часов при температурах окружающей среды.

Таблица 5 – Результаты исследования стабильность при замораживании и оттаивании с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 4 FTC: число циклов замораживания и оттаивания, н.о.: не определено, TDRI: общее количество связанных с лекарственным средством примесей, TLRI: общее количество связанных с липидами примесей.

FTC	Размер частиц (нм)	PDI	TDRI (% площадь/площадь)	TLRI (% площадь/площадь)	Свободный DOX (%)
0	134	0,12	2,8	2,3	6,6
1	126	0,09	2,8	3,1	6,0
2	129	0,09	н.о.	н.о.	н.о.
3	129	0,10	н.о.	н.о.	9,3

Таблица 6 – Результаты стабильности на стенде (способность к хранению при температурах окружающей среды) с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 4. н.о.: не определено, TDRI: общее количество связанных с лекарственным средством примесей, TLRI: общее количество связанных с липидами примесей.

Момент времени (ч.)	Размер частиц (нм)	PDI	TDRI (% площадь/площадь)	TLRI (% площадь/площадь)	Свободный DOX (%)
0	134	0,12	2,8	2,3	6,6
4	127	0,10	3,0	3,1	4,3
8	126	0,10	2,8	н.о.	7,0

Таблица 7 – Исследование биораспределения на серых крысах с подкожной саркомой BN175 на задней конечности, полученное с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (небольшой лабораторный масштаб относительно крупномасштабного способа производства). Концентрация DOX (нг/мг) в выбранных органах и опухолевых тканях.

	Способ производства в небольшом лабораторном масштабе	Крупномасштабный способ производства
опухоль с НТ	47,5±25,4	49,2±4,3
опухоль без НТ	3,0±0,9	Не измерено
сердце	4,5±0,8	3,7±0,5
печень	13,2±2,0	14,7±2,8
селезенка	18,3±2,9	19,9±0,6
почка	19,6±2,9	16,9±2,5

5

Исследование BD проводили для связывания DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, полученной в способе небольшого лабораторного масштаба и крупномасштабного способа производства (партия 1). Для исследования ~250-300 граммовым серым мышам подкожно имплантировали 1 мм³ фрагмент опухоли саркомы BN175 на каждой задней конечности за 7-10 дней до эксперимента. Как только одна опухоль достигала 1 см³, ее подвергали 1-часовой НТ + обработке DPPG₂-TSL_{30%}-DOX (2 мг DOX на кг веса тела). Вкратце, температура датчик измерения температуры помещали внутрь ядра опухоли, с последующим позиционированием нагревающей лампы для доведения опухоли до 41°C, что в среднем занимало до 20 минут для достижения этой целевой температуры. Как только опухоль достигала 41°C, составы вводили внутривенно через катетер в хвостовой вене, и опухоль нагревали в течение еще часа. После обработки опухоли, сердце, печень, селезенку и почки иссекали и концентрацию DOX измеряли (таблица 7), используя ВЭЖХ. Уровни DOX в тканях не показывали различия в профиле BD между обоими протестированными составами. Стандартное отклонение для нагретых опухолей с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX, полученной крупномасштабным способом, было выше из-за более широкого диапазона размеров опухолей (выраженных измеренным весом опухоли), исследованных в настоящем исследовании. Вес опухоли составлял 651 ± 264 мг по сравнению с 661 ± 120 мг, соответственно. Лежащее в основе влияние размера опухоли на эффективность накопления DOX было показано ранее [6]. Животные, обработанные с помощью DPPG₂-TSL_{30%}-DOX,

10

15

20

полученной масштабированным способом, показали среднее отношение повышения DOX между индивидуумами в нагретой опухоли относительно ненагретой $47,5/3,0 = 15,8$. Это находится в диапазоне для отношения, полученного с DPPG₂-TSL_{30%}-DOX уровня техники, полученного с 300 мМ цитрата pH 4 в качестве внутрилипосомного буфера, было
5 отношением увеличения в диапазоне от 13 до 17 [6], показывая, что стабилизация состава по изменению, например, вспомогательных веществ, отношению АФИ:липид, размеру пузырька (см. примеры выше), не имела отрицательного влияния на терапевтическую эффективность.

Терапевтические исследования проводили с аналогичной опухолью BN175 (5 мм в
10 диаметре; по любому размеру) и моделью лечения, как указано выше. В отличие от исследования BD, только одна опухоль имплантировалась в заднюю конечность, чтобы избежать необходимости окончания эксперимента из-за неконтролируемого роста необработанной опухоли. Помимо DPPG₂-TSL_{30%}-DOX партии 1, животных обрабатывали
15 нелипосомным составом DOX (лекарственный продукт, одобренный для применения для людей) и физиологическим солевым раствором (0,9% NaCl). Все животные получали дополнительно 1-часовое местное HT (41°C) опухоли, как описано выше, для исследования BD. После обработки опухоли измеряли капилляром через день и животных умерщвляли, когда опухоли достигали объема 2,5 мм³ или когда изъязвление было очевидным. Лечение
крыс с помощью DPPG₂-TSL_{30%}-DOX показало значительно улучшенную задержку роста
20 опухоли относительно животных, которых лечили солевым раствором ($p < 0,01$, фиг. 13). Кроме того, по сравнению с обработкой нелипосомным DOX в эквивалентной дозе DPPG₂-TSL_{30%}-DOX также давала значительную задержку роста опухоли и более длительное выживание ($p < 0,05$, фиг. 13).

Формула изобретения

1. Термочувствительная липосома, содержащая бислой и внутрилипосомальный буфер,
где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-
фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет по меньшей мере 15
5 процентов,
где указанная термочувствительная липосома содержит активный
фармацевтический ингредиент, и
где молярное соотношение указанного активного фармацевтического
ингредиента и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,05 до
10 не более 0,3.
2. Термочувствительная липосома по п. 1, где указанный активный фармацевтический
ингредиент содержится в указанном внутрилипосомальном буфере.
3. Термочувствительная липосома по п. 2,
где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой
15 доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически
приемлемую соль,
где молярное соотношение доксорубина, указанного производного
доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов,
содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10,
20 предпочтительно от 0,07 до не более 0,09.
4. Термочувствительная липосома по п. 2,
где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой
иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую
соль,
25 где молярное соотношение иринотекана, указанного производного
иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов,
содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18,
предпочтительно по меньшей мере 0,20.
5. Термочувствительная липосома по п. 2,
30 где указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой
гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую
соль,
где молярное соотношение гемцитабина, указанного производного
гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов,

содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, предпочтительно по меньшей мере 0,15.

6. Термочувствительная липосома, содержащая бислой и внутрилипосомальный буфер, где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет по меньшей мере 15 процентов,

где указанная термочувствительная липосома содержит активный фармацевтический ингредиент, где предпочтительно указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8,

где предпочтительно молярное соотношение указанного активного фармацевтического ингредиента и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,05 до не более 0,3,

где более предпочтительно

указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль, где еще более предпочтительно молярное соотношение указанного доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, наиболее предпочтительно от 0,07 до не более 0,09, или

указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, где еще более предпочтительно молярное соотношение указанного иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, наиболее предпочтительно по меньшей мере 0,20, или

указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, где еще более предпочтительно молярное соотношение указанного гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически

приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, наиболее предпочтительно по меньшей мере 0,15.

7. Композиция, содержащая термочувствительную липосому, диспергированную в буфере для хранения,

где концентрация соли указанного буфера для хранения составляет менее чем 100 мМ, и осмолярность указанного буфера для хранения составляет более чем 300 мОсмоль/кг;

где указанная термочувствительная липосома содержит бислой и внутрилипосомальный буфер;

где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет по меньшей мере 15 процентов;

где указанная термочувствительная липосома содержит активный фармацевтический ингредиент;

где предпочтительно указанный внутрилипосомальный буфер характеризуется pH от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8;

где предпочтительно молярное соотношение указанного активного фармацевтического ингредиента и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,05 до не более 0,3,

где более предпочтительно

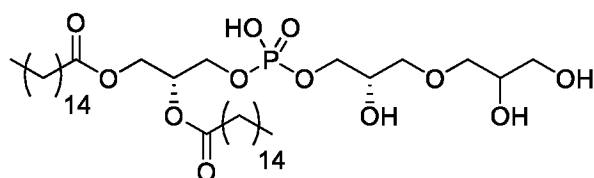
указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой доксорубин, производное доксорубина или его фармацевтически приемлемую соль, где еще более предпочтительно молярное соотношение указанного доксорубина, указанного производного доксорубина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет от 0,06 до не более 0,10, наиболее предпочтительно от 0,07 до не более 0,09, или

указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой иринотекан, производное иринотекана или его фармацевтически приемлемую соль, где еще более предпочтительно молярное соотношение указанного иринотекана, указанного производного иринотекана или его указанной фармацевтически приемлемой соли и

липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,18, наиболее предпочтительно по меньшей мере 0,20, или указанный активный фармацевтический ингредиент представляет собой гемцитабин, производное гемцитабина или его фармацевтически приемлемую соль, где еще более предпочтительно молярное соотношение указанного гемцитабина, указанного производного гемцитабина или его указанной фармацевтически приемлемой соли и липидов, содержащихся в указанном бислое, составляет по меньшей мере 0,12, наиболее предпочтительно по меньшей мере 0,15; и

где предпочтительно указанная композиция содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество, которое может дополнительно способствовать улучшению доставки указанной композиции и/или указанной термочувствительной липосомы к ткани и/или клетке и/или в ткань и/или клетку.

8. Термочувствительная липосома по любому из пп. 1-6 или композиция по п. 7, где концентрация указанного DPPG₂ в указанном бислое составляет от 15 мол. % до не более 35 мол. %, предпочтительно от 20 мол. % до не более 30 мол. %.
9. Термочувствительная липосома по любому из пп. 1-6 или п. 8 или композиция по п. 7 или п. 8, где указанная термочувствительная липосома характеризуется диаметром от 100 нанометров до не более 200 нанометров, предпочтительно от 100 нанометров до не более 150 нанометров.
10. Термочувствительная липосома по любому из пп. 1-6 или пп. 8-9 или композиция по любому из пп. 7-9, где указанный бислой не содержит холестерин или его производное.
11. Термочувствительная липосома по любому из пп. 1-6 или пп. 8-10 или композиция по любому из пп. 7-10, где указанный 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерин (DPPG₂) представлен формулой (IV):



Формула (IV).

12. Термочувствительная липосома по любому из пп. 1-6 или пп. 8-11 или композиция по любому из пп. 7-11, где указанный бислой содержит 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-

фосфохолин (DPPC) и/или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC).

13. Термочувствительная липосома по п. 11 или композиция по п. 11,

где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) в указанном бислое составляет от 0,45 до не более 0,65, предпочтительно от 0,45 до не более 0,55; и/или

где молярная концентрация 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,25; и/или

где молярная концентрация 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфодиглицерина (DPPG₂) в указанном бислое составляет от 0,15 до не более 0,35, предпочтительно от 0,25 до не более 0,35.

14. Термочувствительная липосома по любому из пп. 1-6 или пп. 8-13 или композиция по любому из пп. 7-13 для применения в качестве лекарственного препарата, где предпочтительно указанная термочувствительная липосома или указанная композиция предназначена для применения в лечении, облегчении, задержке, излечении и/или предупреждении рака.

15. Способ получения липосомы, предпочтительно термочувствительной липосомы по любому из пп. 1-6 или пп. 8-14, включающий:

а) получение незагруженной липосомы, где указанная незагруженная липосома содержит бислоем с таким же липидным составом, что и у указанной липосомы, и где указанная незагруженная липосома не содержит активный фармацевтический ингредиент, содержащийся в указанной липосоме,

ас) предпочтительно экструдирование указанной незагруженной липосомы,

б) обеспечение загрузки указанной незагруженной липосомы активным фармацевтическим ингредиентом путем активной загрузки с использованием буфера для загрузки с образованием загруженной липосомы, где указанный буфер для загрузки характеризуется концентрацией соли, составляющей по меньшей мере 66 мМ, предпочтительно от 66 мМ до не более 120 мМ, и осмолярностью, составляющей по меньшей мере 250 мОсмоль/кг, предпочтительно от 250 мОсмоль/кг до не более 350 мОсмоль/кг, где указанную загрузку предпочтительно осуществляют при температуре от 35°C до 39°C, более предпочтительно от 36°C до 38°C, наиболее предпочтительно от 37°C до 38°C;

с) замену указанного буфера для загрузки буфером для хранения, при этом указанный буфер для хранения характеризуется концентрацией соли,

составляющей менее чем 100 мМ, и осмолярностью, составляющей более чем 300 мОсмоль/кг,

- 5 d) предпочтительно хранение указанной загруженной липосомы в указанном буфере для хранения от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 20 недель при температуре приблизительно 5°C, или от 1 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C, или от 12 до не более 16 месяцев при температуре приблизительно -20°C.

10 16. Способ получения липосомы по п. 15, где указанное а) получение указанной незагруженной липосомы включает:

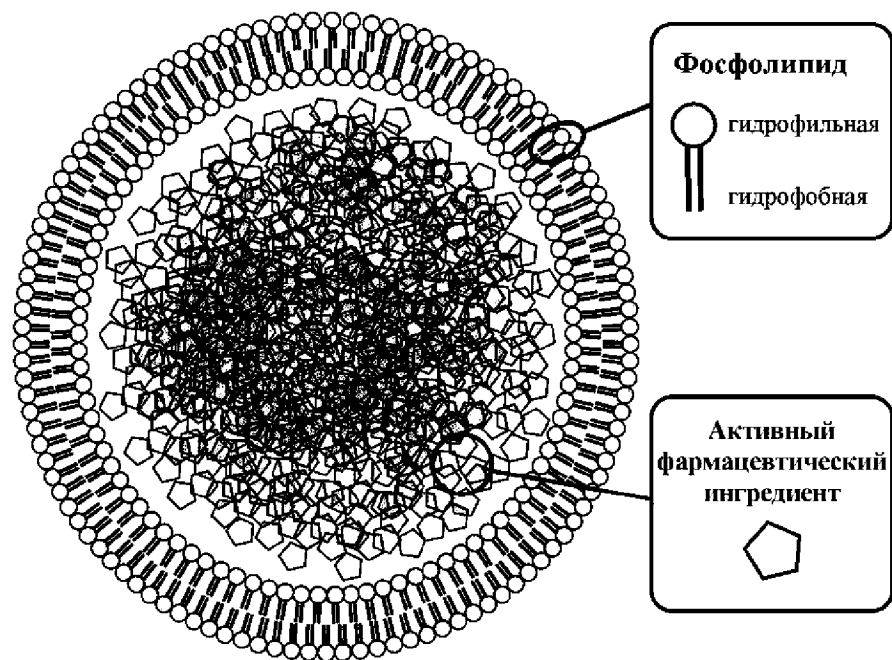
aa) получение раствора липидов в органическом растворителе с таким же молярным соотношением, что и липидов в бислое указанной липосомы, при этом предпочтительно указанный органический растворитель представляет собой смесь хлороформ/метанол 9:1 (об./об.), хлороформ или этанол; и

15 ab) смешивание указанного раствора липидов с водным раствором, где указанный водный раствор характеризуется по сути таким же составом, что и внутрилипосомальный буфер, содержащийся в указанной липосоме, при отсутствии указанного активного фармацевтического ингредиента, где предпочтительно указанный водный раствор характеризуется рН от 5 до не более 8, предпочтительно от 6 до не более 8, и

20 где предпочтительно указанный водный раствор содержит буфер, выбранный из группы, состоящей из буфера на основе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, буфера на основе $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, фосфатного буфера и буфера на основе HBS, и

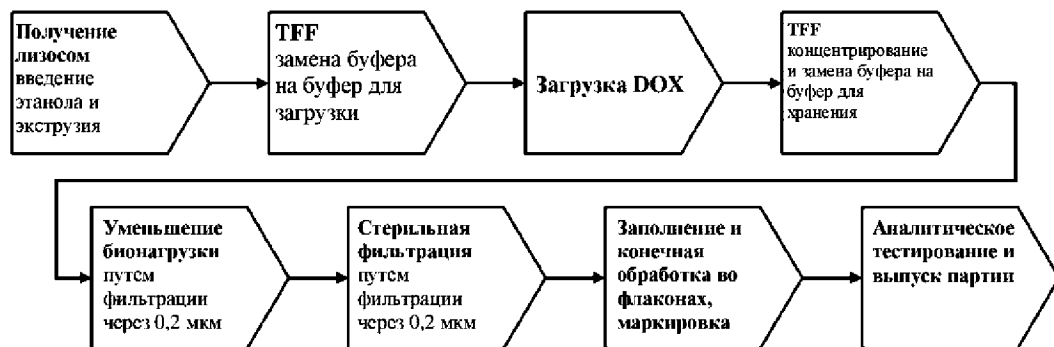
25 где указанное смешивание предпочтительно проводят посредством введения органического растворителя, и

где указанное смешивание приводит к образованию незагруженной липосомы.



Фиг. 1

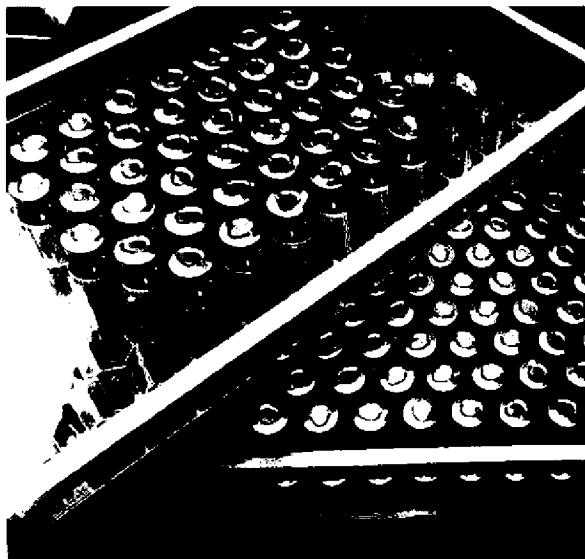
A



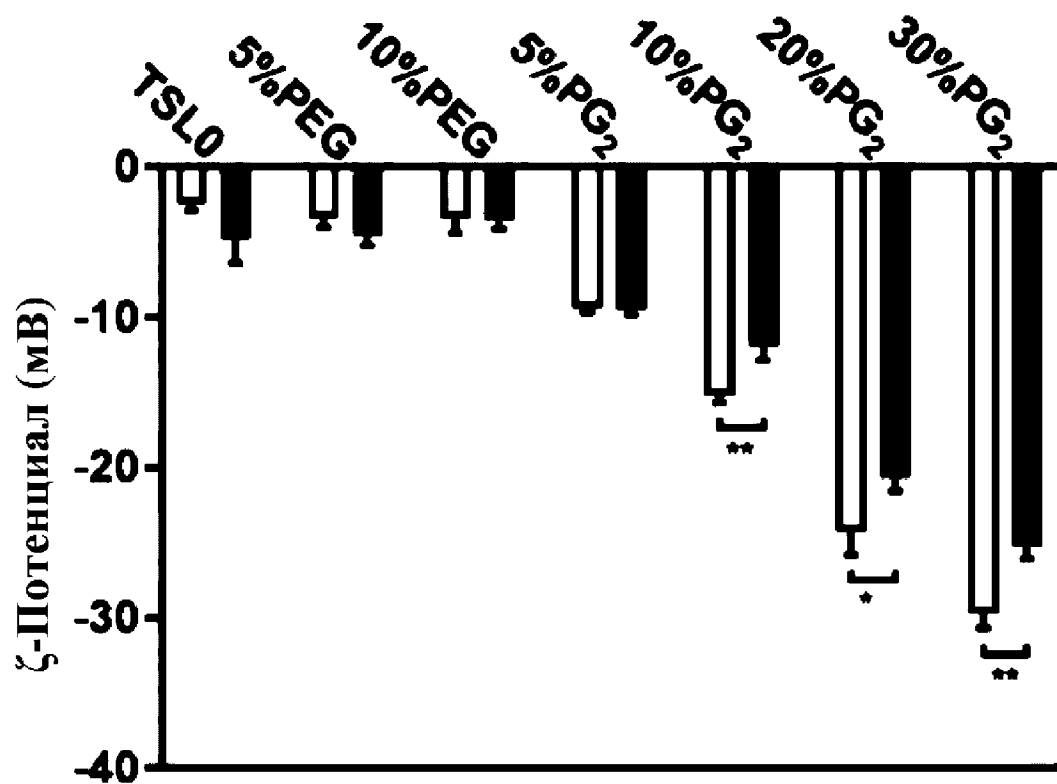
B



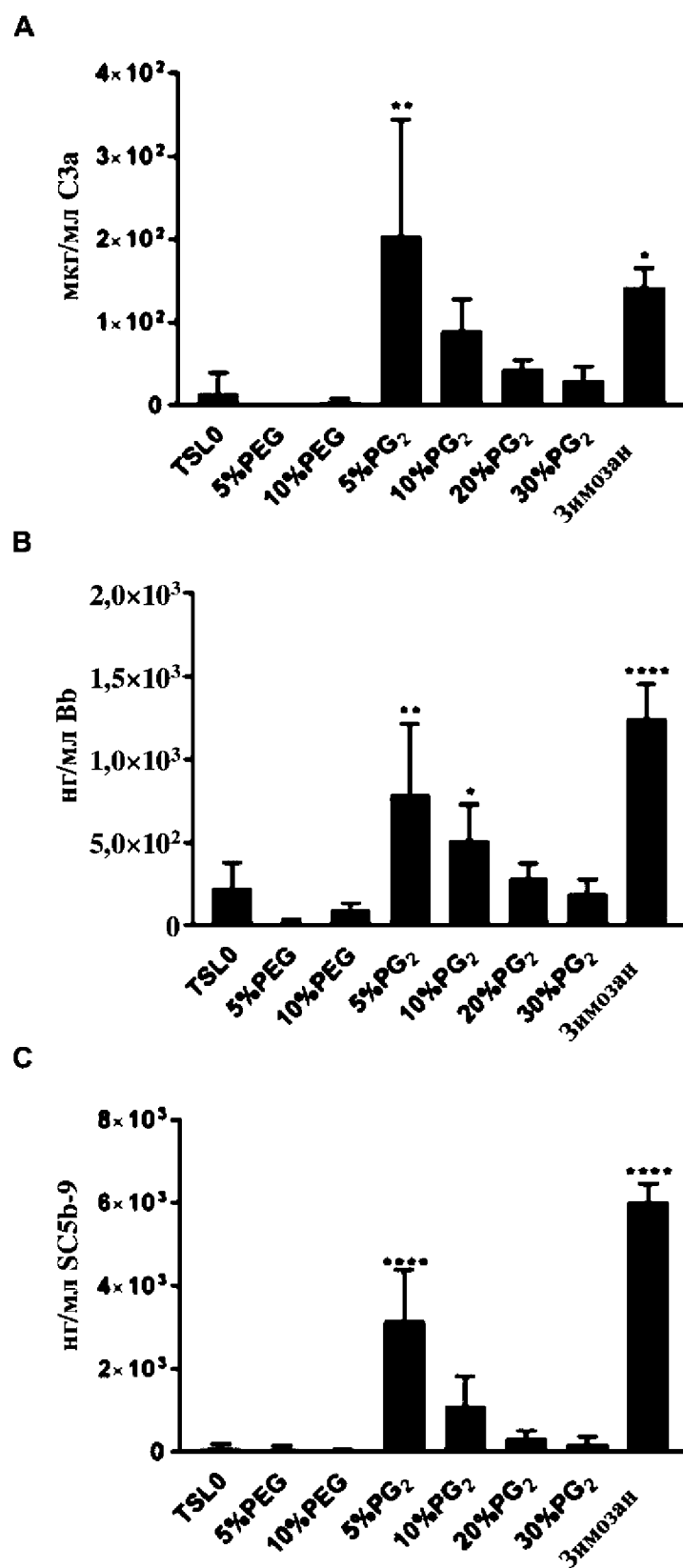
C



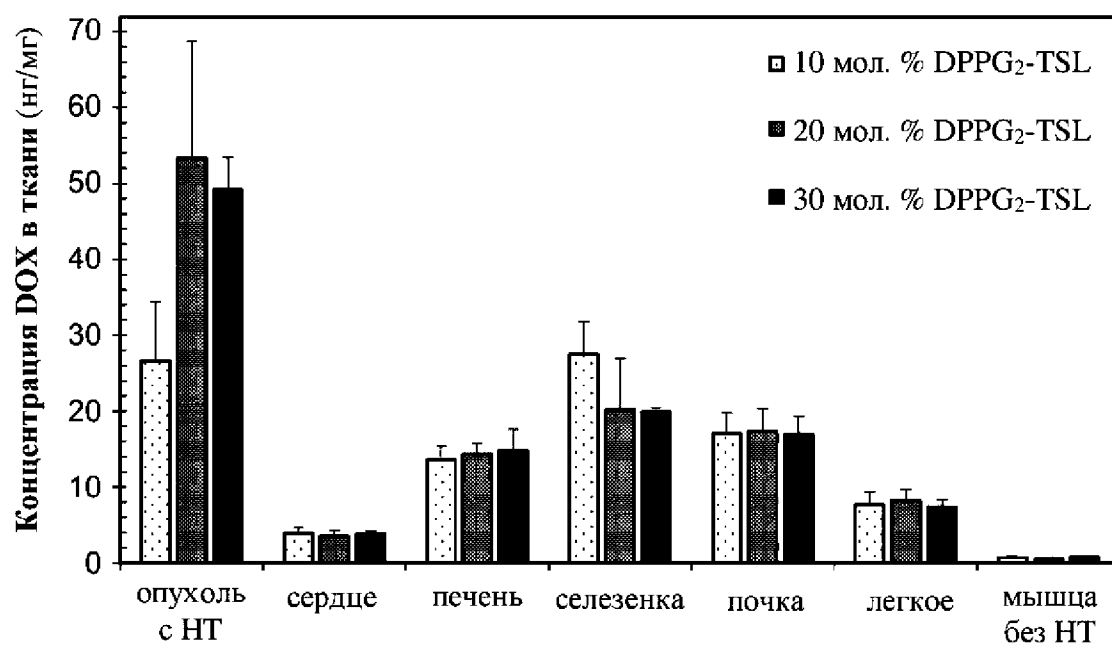
Фиг. 2



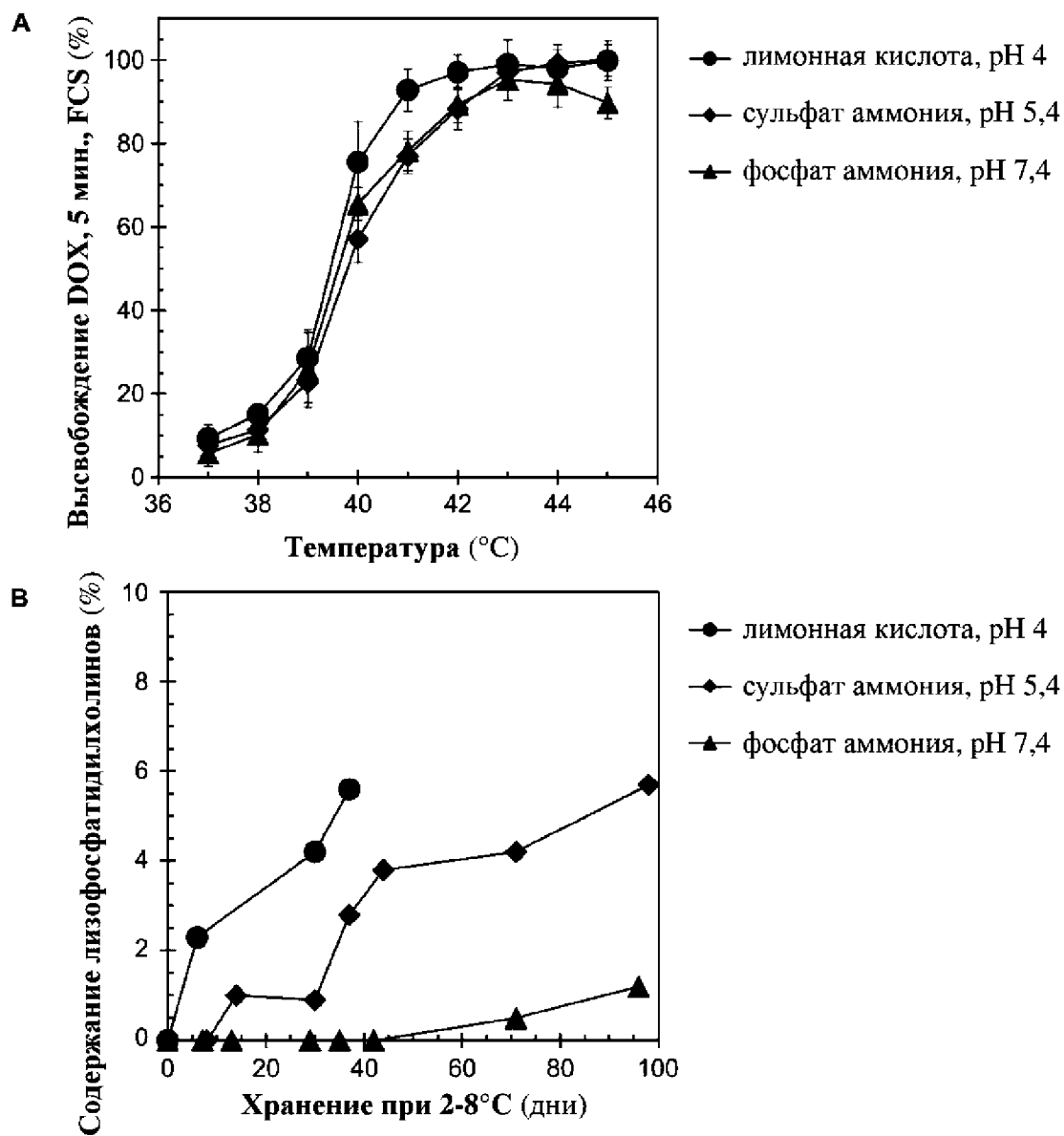
Фиг. 3



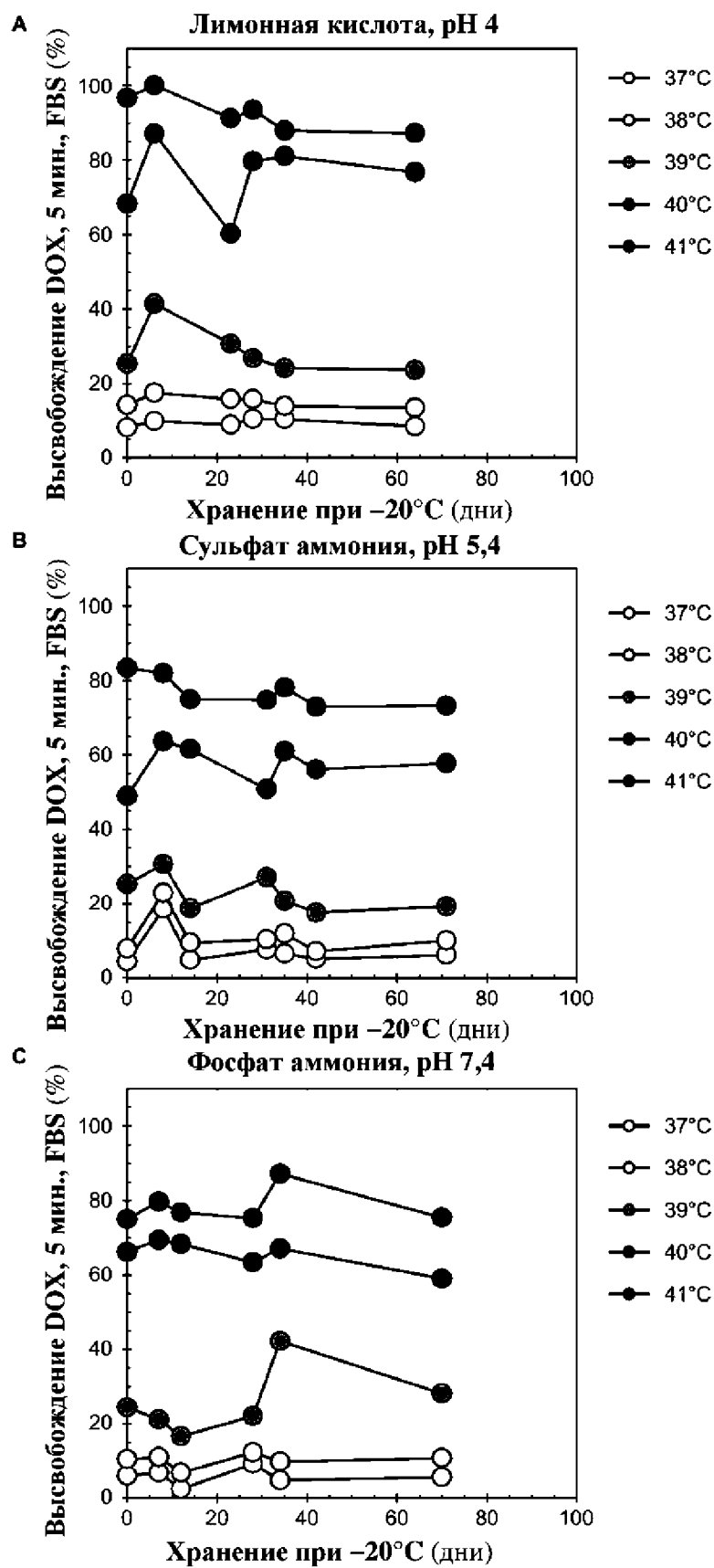
Фиг. 4



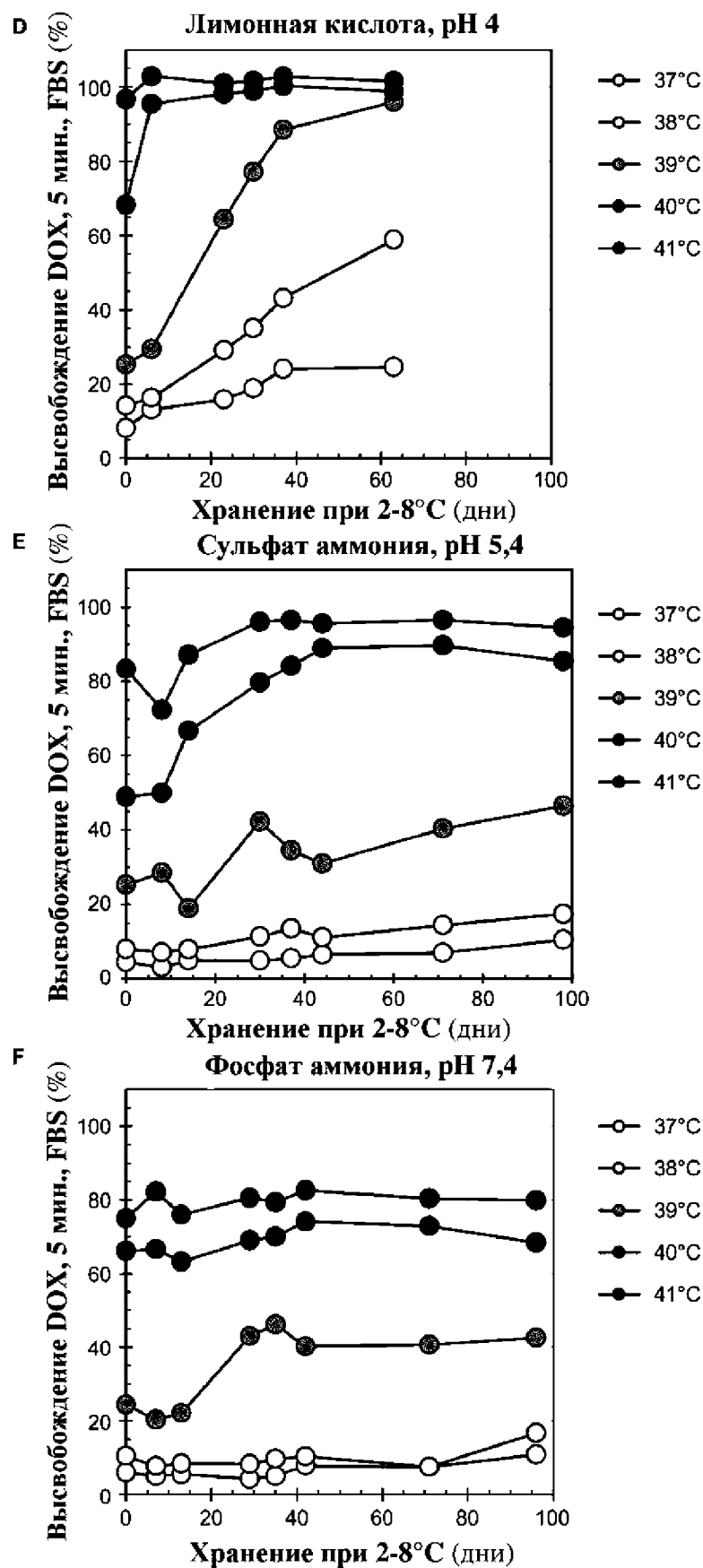
Фиг. 5



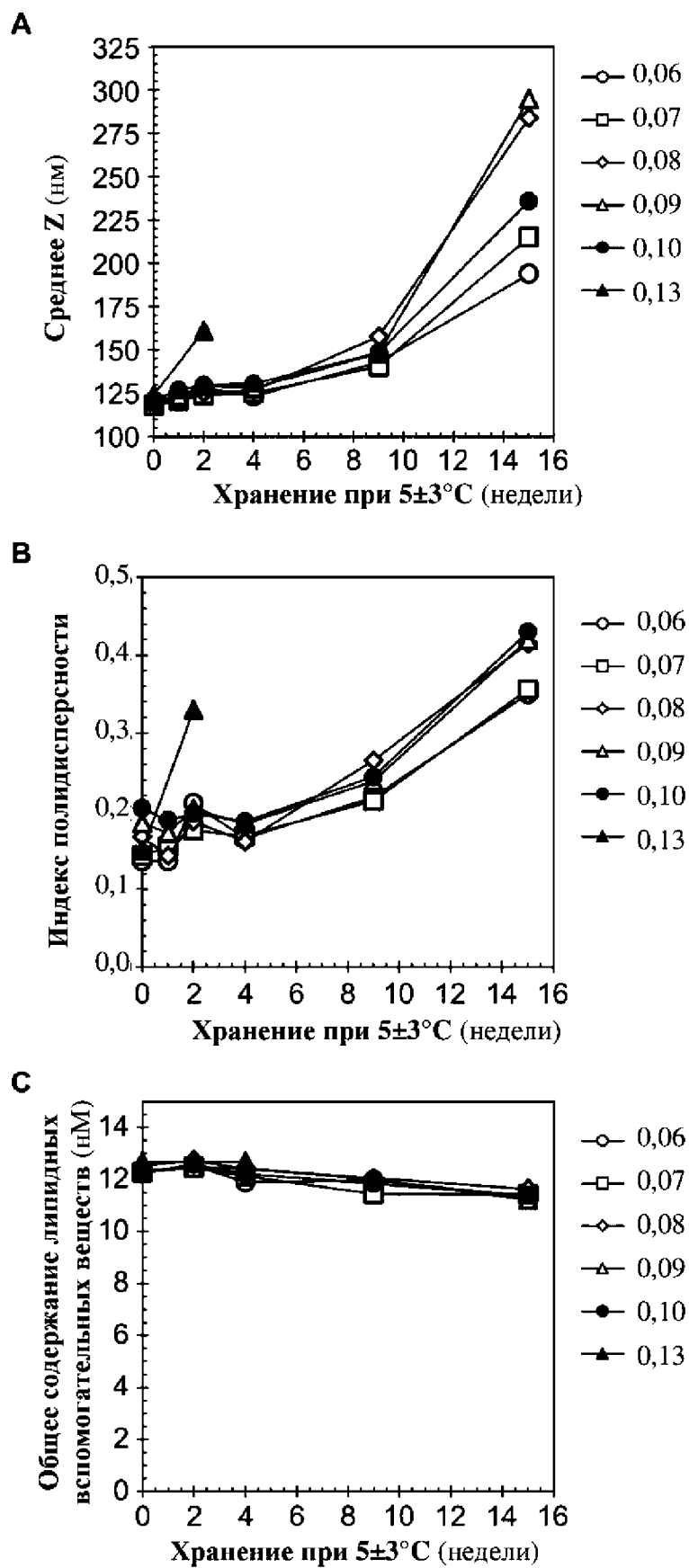
Фиг. 6



Фиг. 7 (часть 1/2)

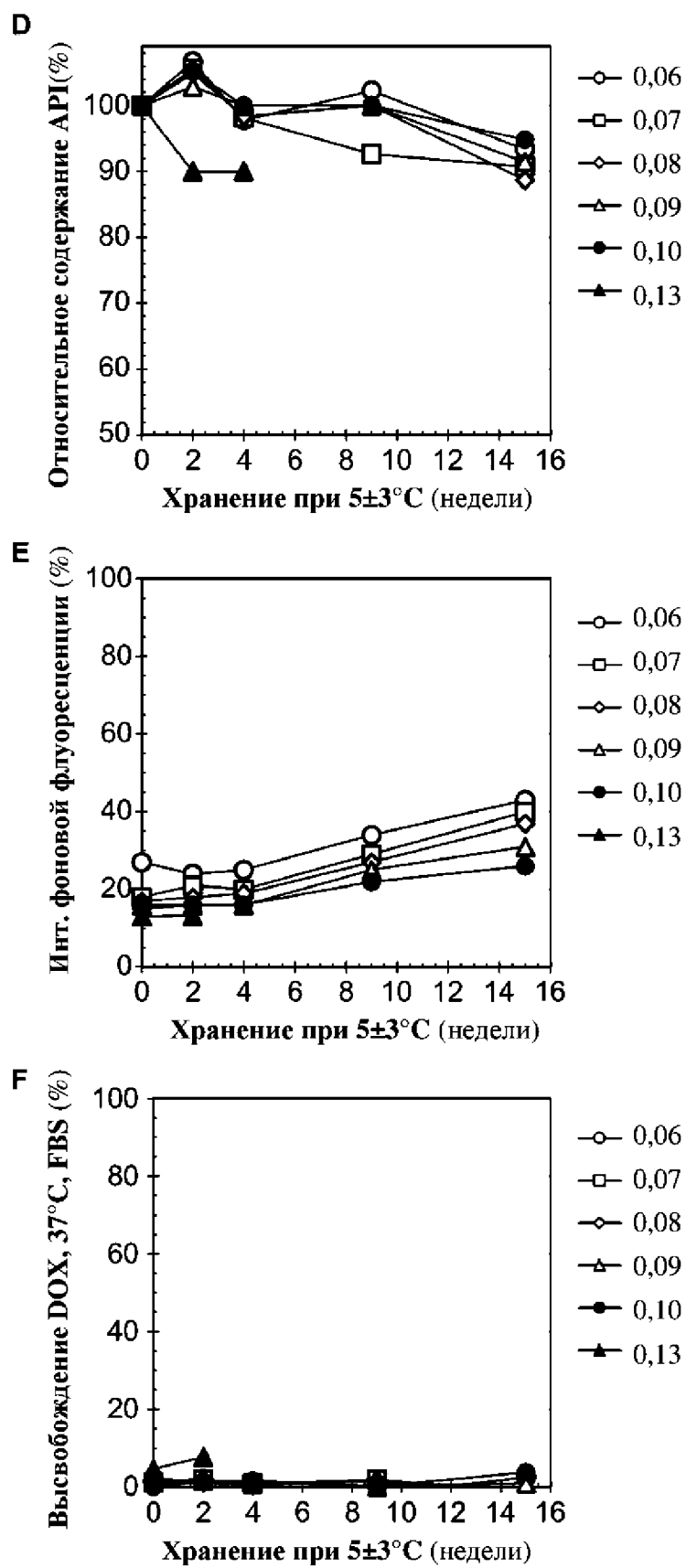


Фиг. 7 (часть 2/2)

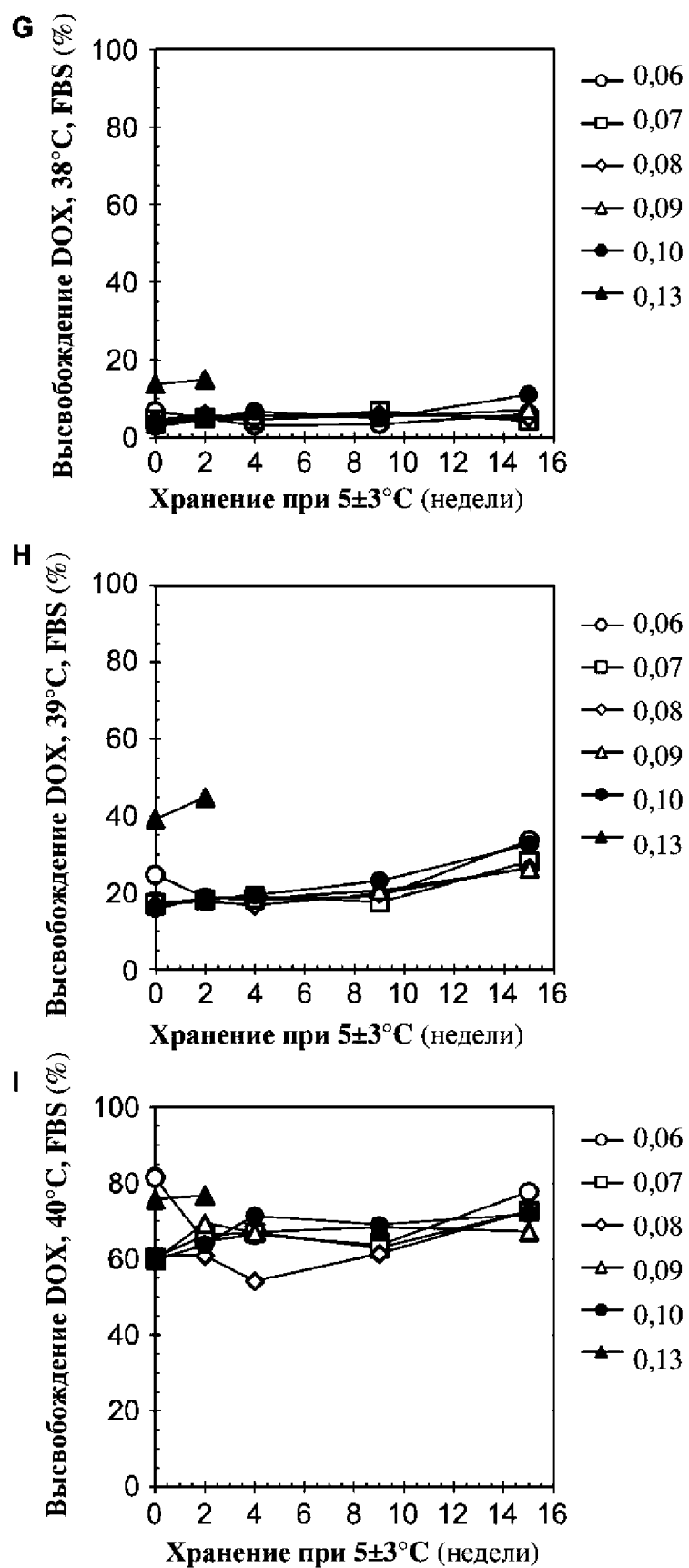


Фиг. 8 (часть 1/3)

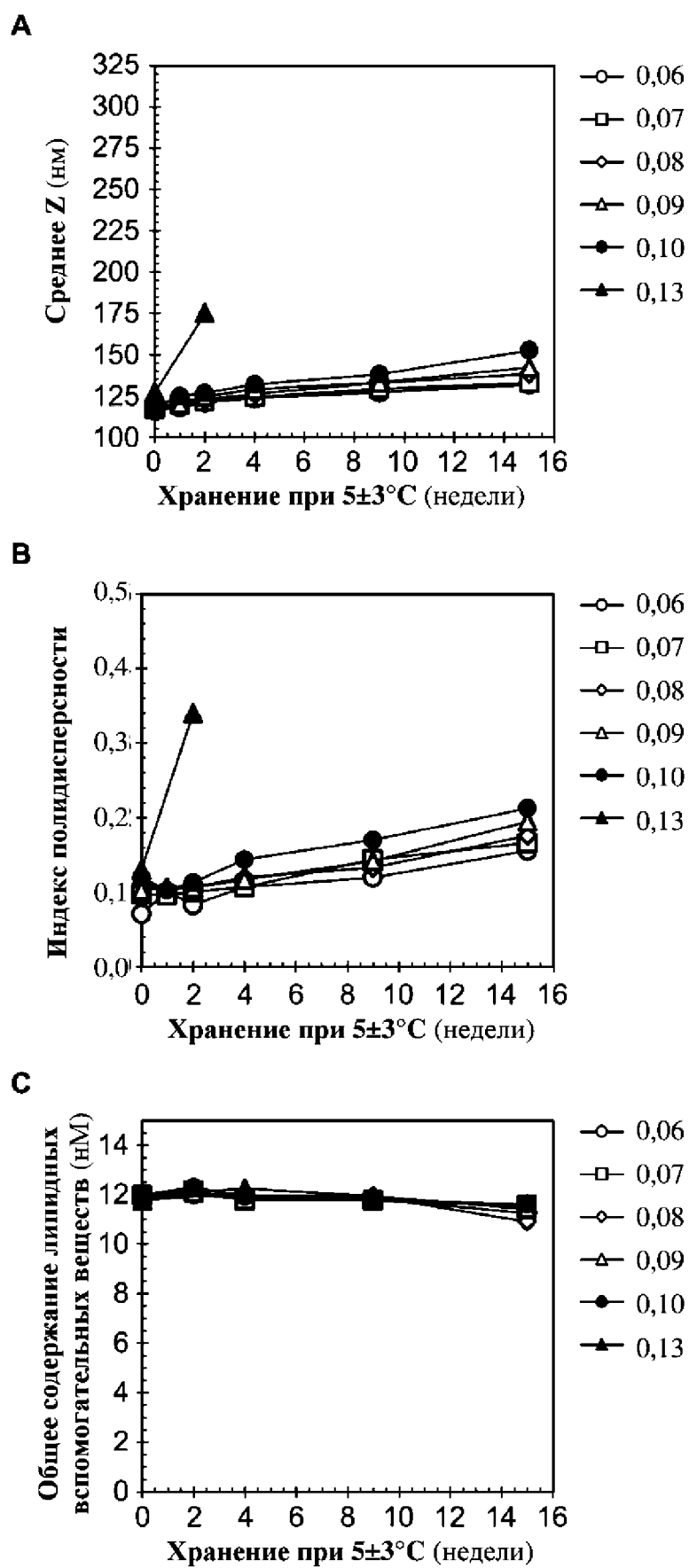
10/22



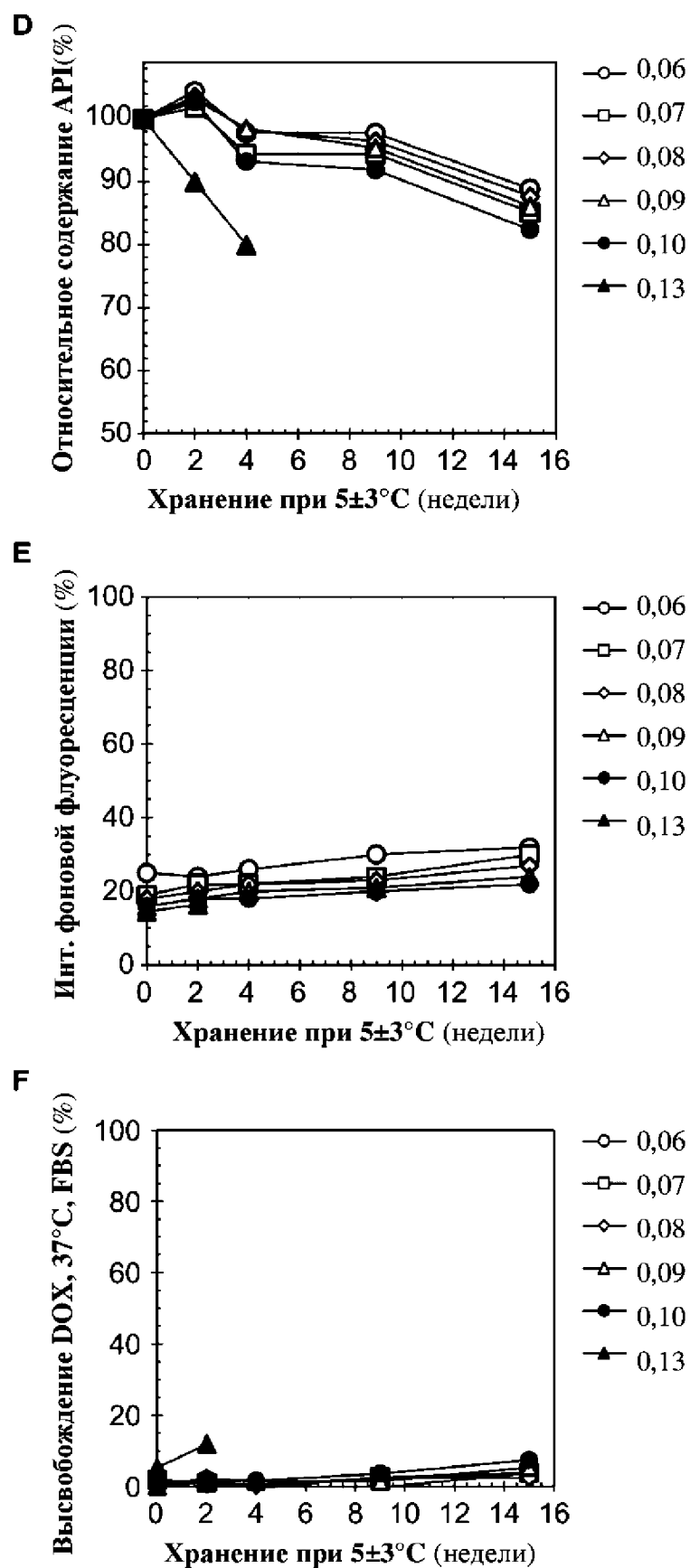
Фиг. 8 (часть 2/3)



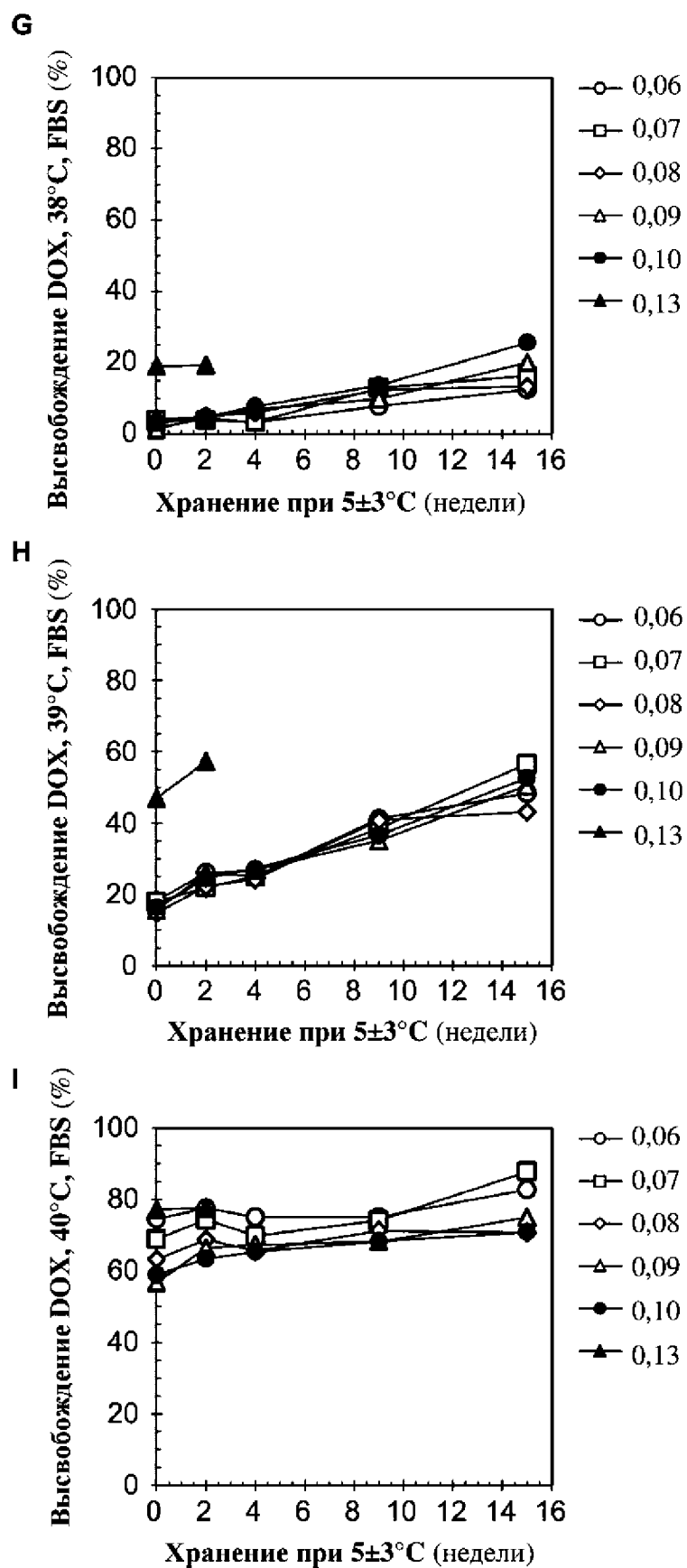
Фиг. 8 (часть 3/3)



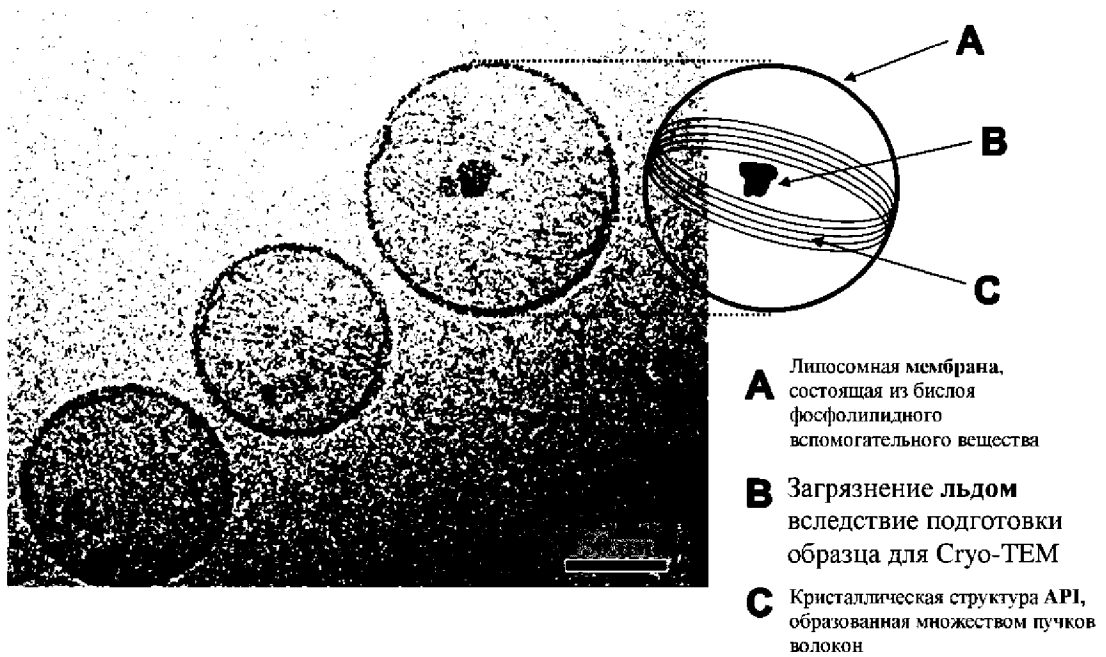
Фиг. 9 (часть 1/3)



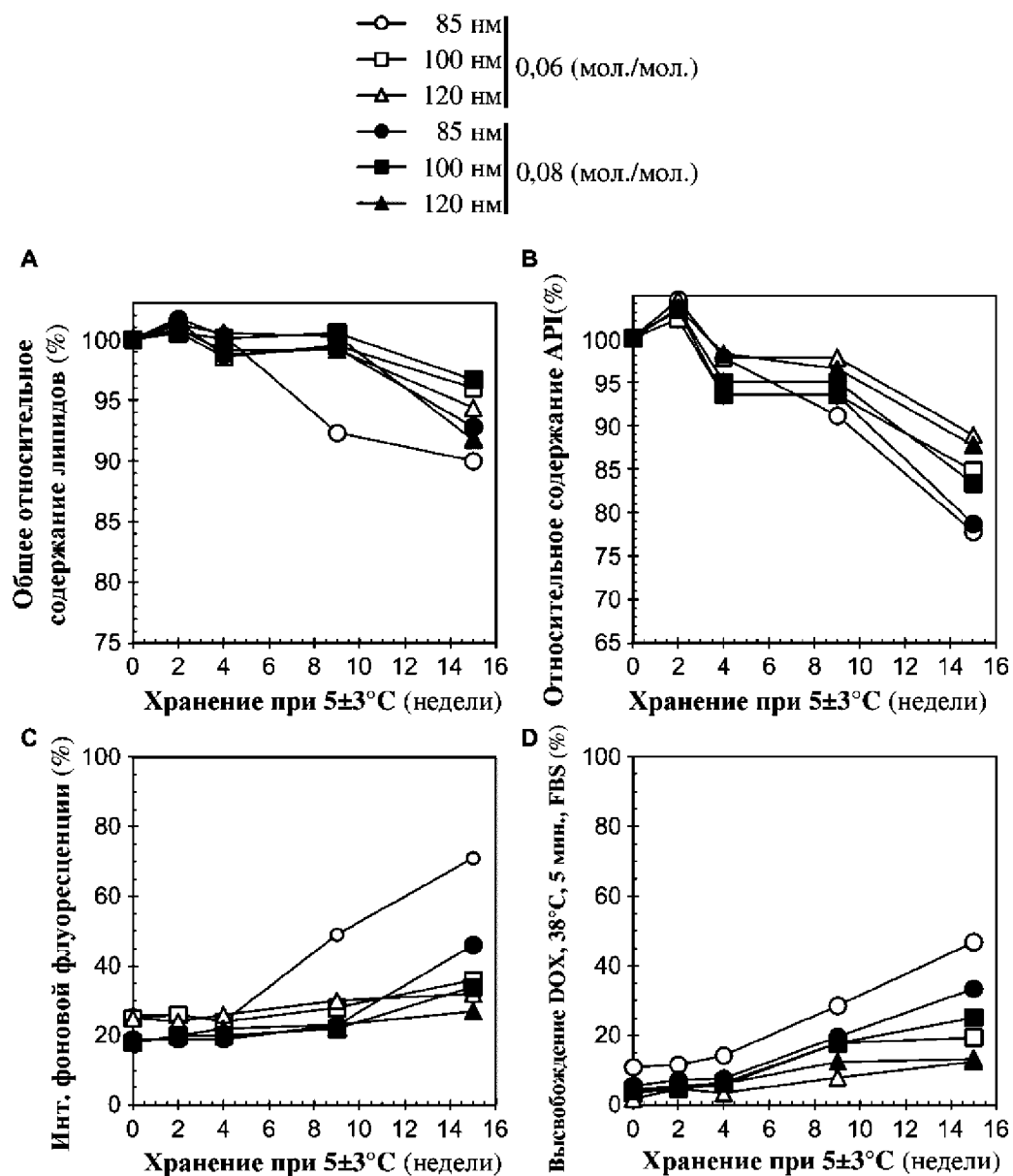
Фиг. 9 (часть 2/3)



Фиг. 9 (часть 3/3)

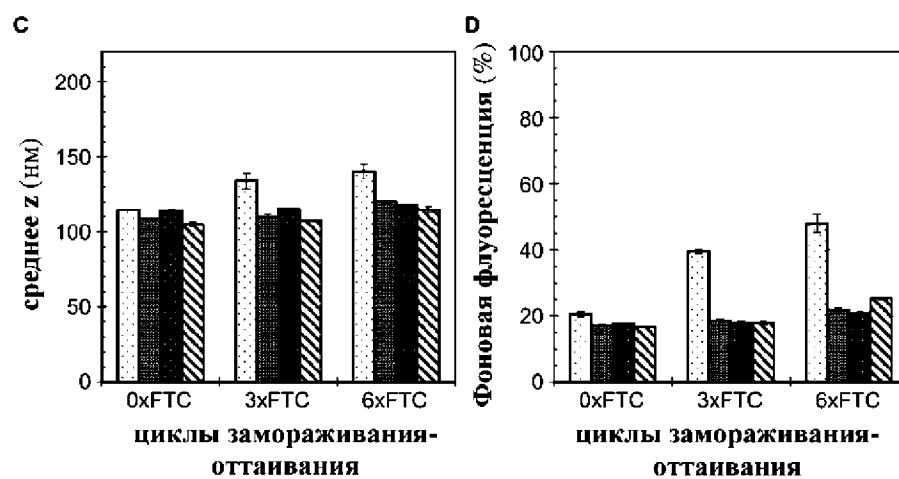
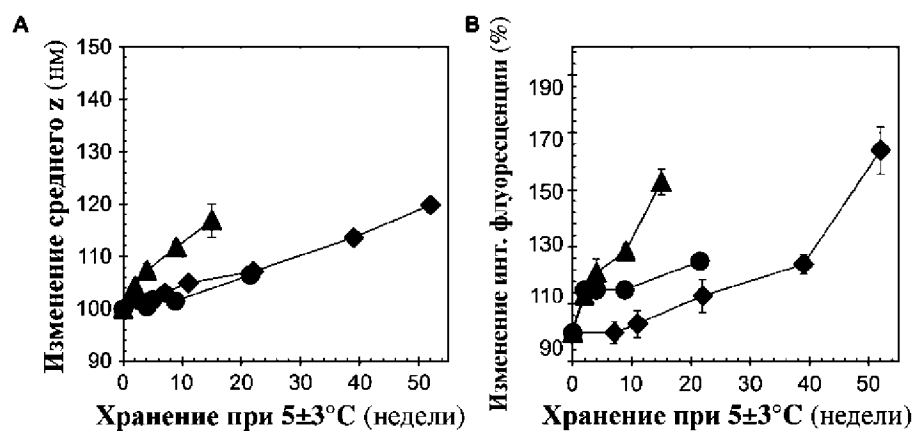


Фиг. 10



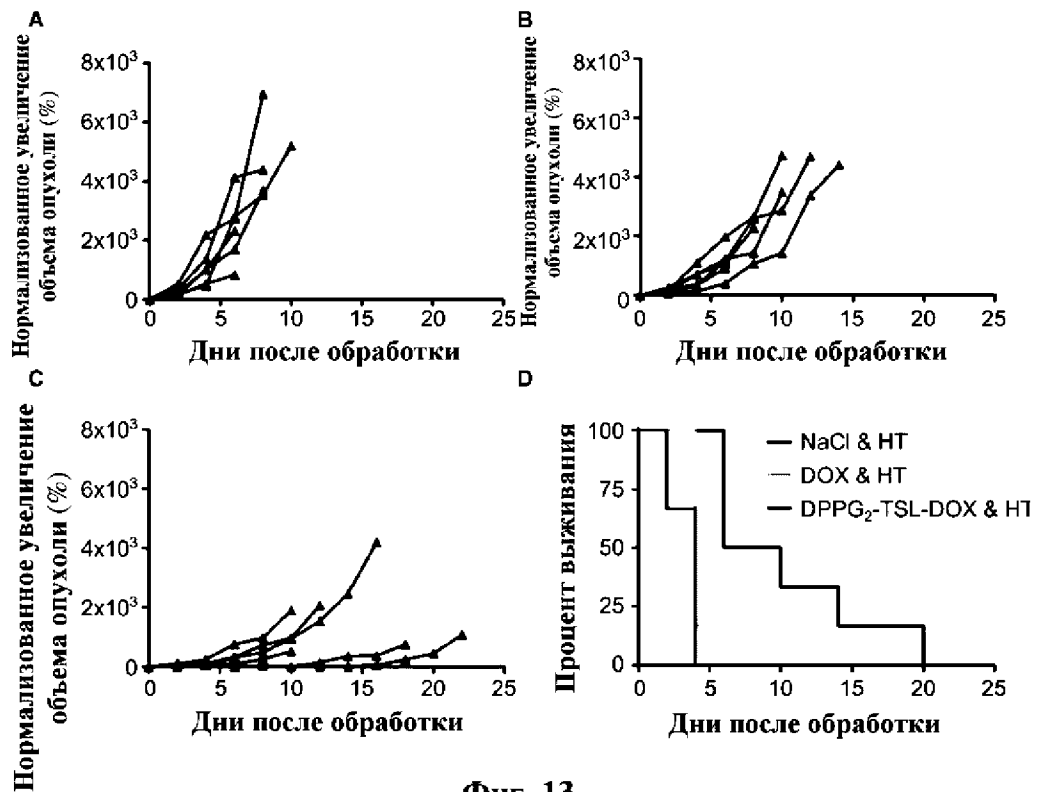
Фиг. 11

- ▲ 0% (вес/об.) трегалоза, физиологический PBS, 300 мОсмоль/кг
- 4,1% (вес/об.) трегалоза, 10,5 мМ фосфата Na/K, 66 мМ NaCl, 294 мОсмоль/кг
- ◆ 10% (вес/об.) трегалоза, 10,5 мМ фосфата Na/K, 499 мОсмоль/кг



- 4,1% трегалоза, 294 мОсмоль/кг, 0,58 мг/мл
- ▨ 10% трегалоза, 501 мОсмоль/кг, 1,79 мг/мл
- 10% трегалоза, 365 мОсмоль/кг, 1,70 мг/мл
- ▩ 10% трегалоза, 365 мОсмоль/кг, 2,58 мг/мл

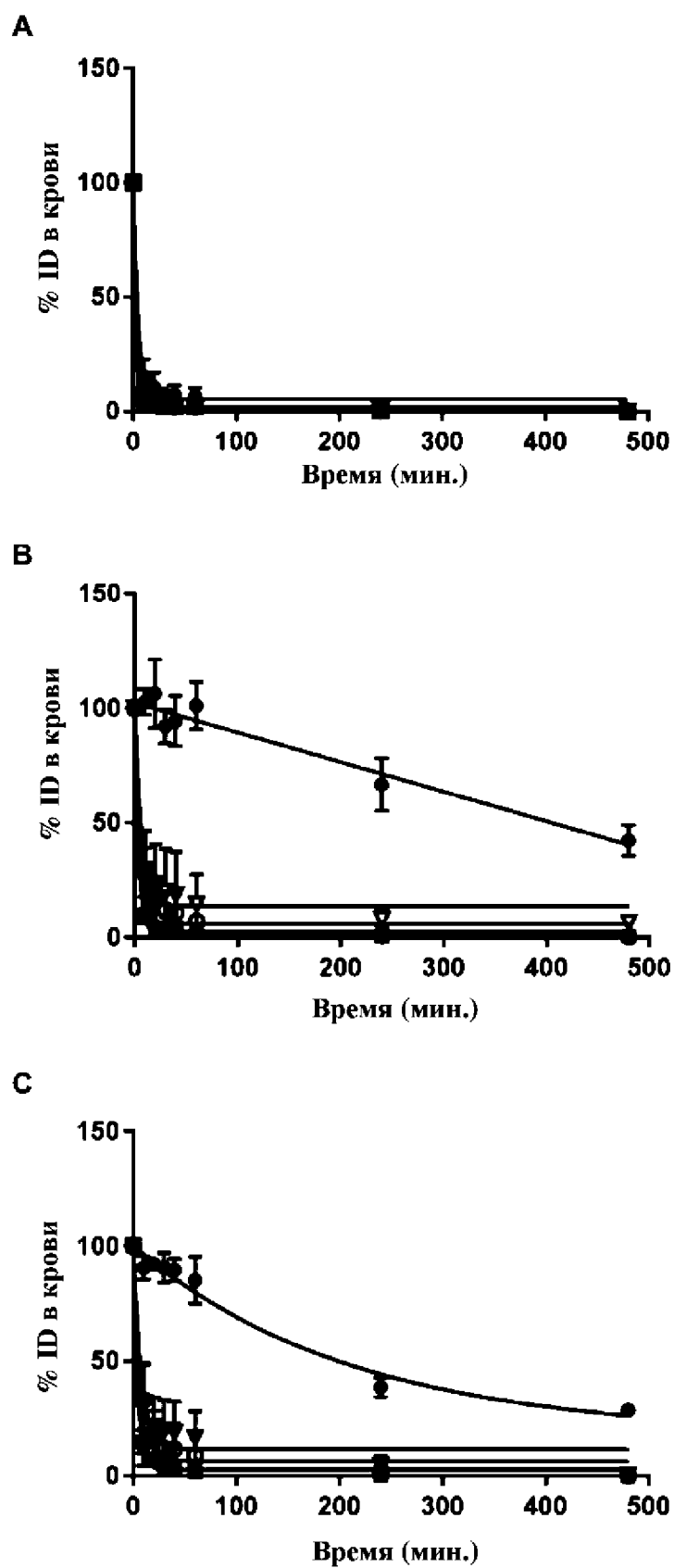
Фиг. 12



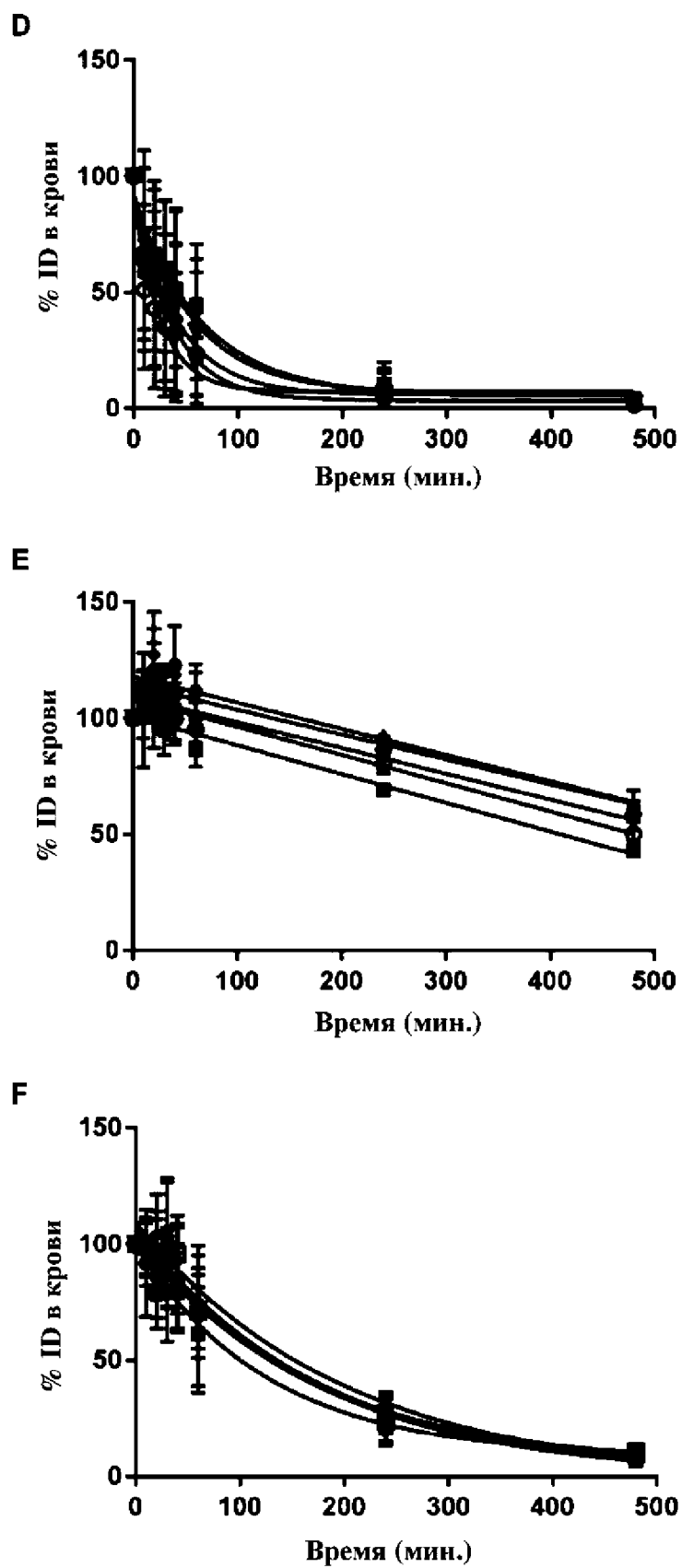
Фиг. 13

	День 0	День 7	День 14	День 21	День 28
РК в день 0	РК введения TSL				
РК в день 7	Введение TSL	РК введения TSL			
РК в день 14	Введение TSL		РК введения TSL		
РК в день 21	Введение TSL			РК введения TSL	
РК в день 28	Введение TSL				РК введения TSL

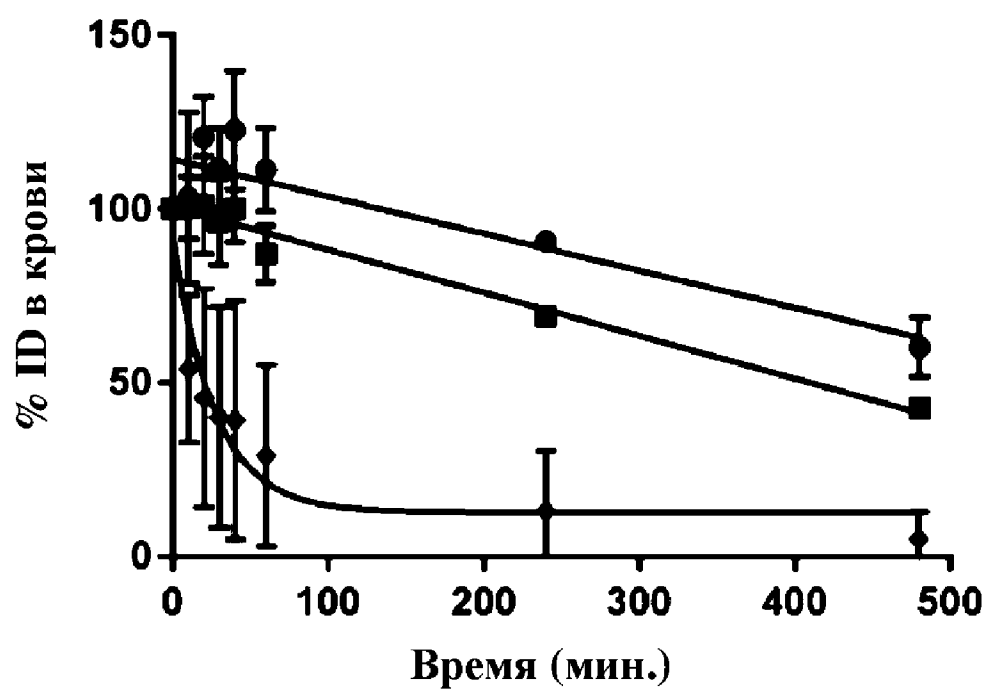
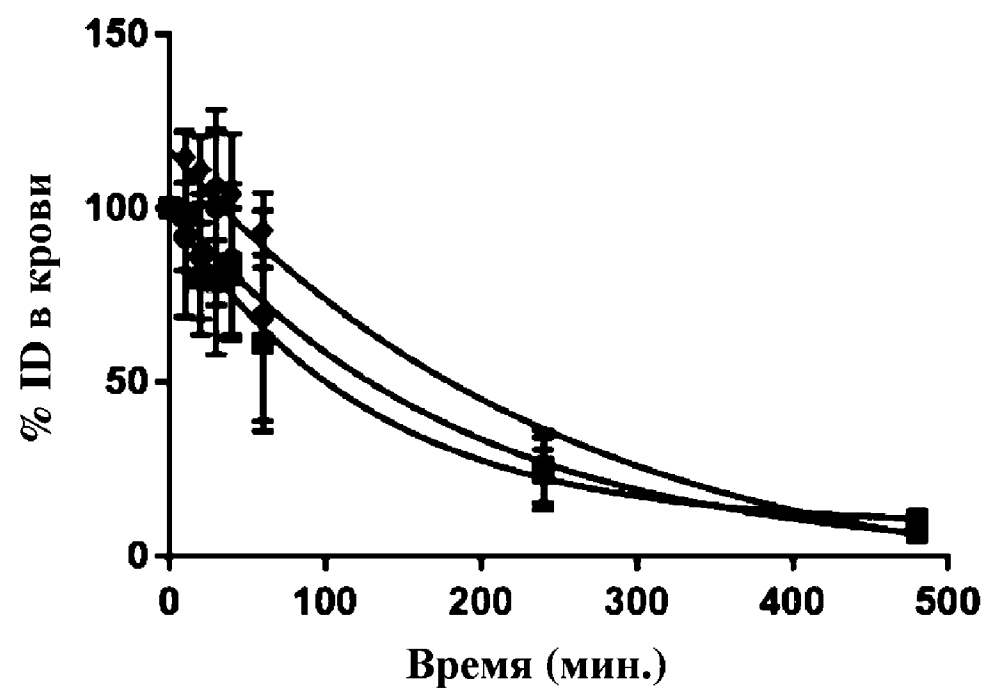
Фиг. 14



Фиг. 15 (часть 1 из 3)



Фиг. 15 (часть 2 из 3)

G**H**

Фиг. 15 (часть 3 из 3)