



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 9/127 (2006.01); A61K 31/475 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015117412, 20.11.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.11.2013

Дата регистрации:
30.05.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.11.2012 US 61/728,378

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2017 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 30.05.2018 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.06.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/071096 (20.11.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/081887 (30.05.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр.
3, ООО "Юридическая фирма "Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**МОНТЕ Вильям Т. (US),
БАРБОСА Кристофер Джеймс (CA),
ВЭБЕР Томас Филип (CA)**

(73) Патентообладатель(и):

**СПЕКТРУМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US),
Арбургус Биофарма Корпорэйшн (CA)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 00/59473 A1, 12.10.2000. WO
2008/080367 A1, 10.07.2008. WO 2009/062398
A1, 22.05.2009.

**(54) УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ЛИПОСОМЫ
ВИНКРИСТИНА ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине. Описаны улучшенные способы эффективного восстановления винкристина, инкапсулированного в липосомы, для внутривенных инъекций (VSLI),

характеризующиеся сниженной вероятностью ошибок при их проведении и сниженной вероятностью загрязнения. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 1 ил., 13 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 9/127 (2006.01); *A61K 31/475* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015117412, 20.11.2013**

(24) Effective date for property rights:
20.11.2013

Registration date:
30.05.2018

Priority:

(30) Convention priority:
20.11.2012 US 61/728,378

(43) Application published: **10.01.2017 Bull. № 1**

(45) Date of publication: **30.05.2018 Bull. № 16**

(85) Commencement of national phase: **22.06.2015**

(86) PCT application:
US 2013/071096 (20.11.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/081887 (30.05.2014)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. Bolshaya Spasskaya, 25, str. 3,
OOO "Yuridicheskaya firma "Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**MONTE Vilyam T. (US),
BARBOSA Kristofer Dzhejms (CA),
VEBER Tomas Filip (CA)**

(73) Proprietor(s):

**SPEKTRUM FARMASYUTIKALZ, INK. (US),
Arbutus Biofarma Korporejshn (CA)**

(54) **IMPROVED METHOD FOR PREPARATION OF ENCAPSULATED VINCRIStINE IN LIPOSOMES FOR THERAPEUTIC USE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine. Improved methods for the effective reduction of vincristine encapsulated in liposomes for intravenous injection (VSLI), characterized by a reduced probability

of errors in their administration and a reduced probability of contamination, are described.

EFFECT: described improved methods for effective reduction of vincristine.

15 cl, 1 dwg, 13 tbl, 3 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №61/728378, озаглавленной «Улучшенный способ получения инкапсулированного в липосомы винкристина для терапевтического применения»,
5 поданной 20 ноября 2012 г., которая включена в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Липосомы представляют собой широко известные наночастицы, способные повышать эффективность терапевтически активных лекарственных средств путем улучшения
10 распределения в плазме и фармакокинетики лекарственных средств по сравнению с неинкапсулированными формами (например, Weinstein, *Liposomes: From Biophysics to Therapeutics*, (Ostro, M. J., ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y., pp. 277-338 (1987)). Например, липосомы с винкристина сульфатом для инъекций (VSLI) представляют собой состав в виде липосом, содержащий противораковое терапевтическое средство винкристина
15 сульфат, инкапсулированный в липосомы из сфингомиелина и холестерина, которые обеспечивают более высокую эффективность по сравнению со стандартным винкристина сульфатом для инъекций USP (VSI). Клинические испытания также показали, что VSLI способствует интенсификации дозы путем значительного увеличения периода полувыведения винкристина из кровотока по сравнению с неинкапсулированным
20 винкристином. Липосомы обеспечивают механизм замедленного высвобождения лекарственного средства, и размер липосом позволяет лекарственному средству накапливаться в раковых тканях в результате экстравазации (Webb et al, *Cancer Chemother. Pharmacol* 42:461-470, 1998; Shan et al. *Cancer Chemother. Pharmacol* 58:245-255, 2006). Указанные свойства обуславливают улучшенную клиническую эффективность по
25 сравнению со стандартным VSI.

Инкапсулирование винкристина сульфата в липосомы из сфингомиелина и холестерина обычно проводят с применением кислого внутрилипосомного pH (например, pH 4) и внешней среды с нейтральным pH (например, pH 7). Указанный
30 градиент pH обеспечивает возможность диффундирования слабоосновного винкристина во внутреннюю полость липосомы с высокой эффективностью (Cullis et al. *Trends in Biotech* 9:268-272, 1991; Voman et al. *Bioch Biophys Acta*, 1152:253-258, 1993). Для накопления винкристина во внутренней полости липосомы с трансмембранным градиентом pH мембрана липосомы должна становиться временно проницаемой для
35 стерически объемного винкристина. Таким образом, в отличие от нейтральных или анионных лекарственных средств, которые, как правило, могут быть пассивно инкапсулированы в липосомы, для обеспечения действия трансмембранного градиента pH в случае винкристина требуется увеличение температуры липосомы из сфингомиелина и холестерина. Для бислоя липосомы, который образован ориентацией
40 связанных друг с другом молекул сфингомиелина и холестерина, требуется применение уникальной схемы нестационарного нагрева для получения термотропных переходных состояний. Указанные переходные состояния существенно снижают слабые межмолекулярные связи между липидами мембраны с образованием зазоров между связанными друг с другом липидами, что делает бислой липосомы временно проницаемым. В процессе инкапсулирования используют способность спонтанной
45 самоорганизации липидов сфингомиелина и холестерина, наблюдаемой при охлаждении до температуры окружающей среды, в результате которого происходит восстановление целостности мембраны.

Указанный профиль нагрева для инкапсулирования лекарственного средства должен

учитывать химическую нестабильность винкристина при тепловом воздействии (Vendrig et al, Internatl. J. of Pharmaceutics 50:189-196, 1989; Sethi et al, Cancer Res. 45:5386-5389, 1985). Винкристин является термически лабильным и при повышенных температурах легко разлагается до N-десформилвинкристина. Указанный гидролиз до формаимидного производного винкристина является хорошо известным процессом разложения и влияет на стабильность срока годности винкристина сульфата для инъекций (VLSI). Например, растворы VLSI нельзя стерилизовать нагреванием из-за указанной термолабильности и следует хранить и транспортировать при температуре охлаждения для обеспечения длительной стабильности.

Соответственно, в настоящее время липосомы с винкристина сульфатом для инъекций (VSLI) получают из отдельных компонентов в аптечном учреждении в соответствии с инструкциями, приведенными на этикетке, утвержденной FDA (www.accessdata.fda.gov; Reference ID: 3172211, 2012). Указанные инструкции включают нагревание, требующее использования водяной бани для достижения эффективного инкапсулирования винкристина в липосомы из сфингомиелина и холестерина и поддержания химической чистоты винкристина. Превосходные теплопередающие свойства воды позволяют достичь больше чем 95% инкапсулирования винкристина при отсутствии заметного химического разложения лекарственного средства.

Поскольку VSLI представляет собой лекарственное средство для инъекций, производство компонентов и аптечное получение строго регламентированы для поддержания стерильности. Соответственно, использование водяной бани открытого типа в процессе получения VSLI требует дополнительных средств, планирования и оборудования (например, плавающего кольца), включая асептический вытяжной шкаф или «чистую» комнату для поддержания асептической среды. В некоторых аптечных учреждениях невозможно осуществить восстановление VSLI по причине ограничений, связанных с поддержанием стерильной среды.

Соответственно, существует потребность в улучшенных способах получения VSLI, которые могут быть осуществлены эффективным и воспроизводимым образом без использования дополнительных средств и оборудования, необходимых в настоящее время.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение, по меньшей мере частично, основано на разработке способа получения VSLI, который позволяет исключить необходимость использования нагретой водяной бани в процессе инкапсулирования. Таким образом, в настоящем изобретении предложены эффективные, воспроизводимые способы получения VSLI, которые с неожиданной легкостью могут быть широко применены со сниженным риском загрязнения.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтически приемлемой жидкой композиции, содержащей винкристин, инкапсулированный в липосомы, которая, по существу, не содержит продуктов разложения, включающему стадии (a) восстановления в одном флаконе (i) первого раствора, содержащего винкристина сульфат в концентрации от примерно 1 мг/мл до примерно 5 мг/мл, где первый раствор имеет pH от примерно 3,5 до примерно 5,5; и (ii) второго раствора, содержащего липосомы из сфингомиелина и холестерина, с низким pH; (b) повышения pH восстанавливаемого раствора, содержащегося в указанном одном флаконе, до pH от примерно 7,0 до 7,5; (c) нагревания указанного одного флакона, содержащего восстанавливаемый раствор, в термостате сухого нагрева, уравновешенного при примерно 75°C, в течение по меньшей мере от примерно 13 до

примерно 18 минут, где указанный термостат сухого нагрева содержит одну или более лунок, примерно на 1-5% превышающих среднюю длину или диаметр флакона, с получением раствора, содержащего восстановленный винкристин, инкапсулированный в липосомы; (а) уравнивания восстановленного раствора до комнатной температуры; (е) разбавления объема восстановленного раствора, содержащего дозу винкрестина, инкапсулированного в липосомы, для пациента в количестве от примерно 1,5 до примерно 2,4 мг/м², с применением фармацевтического разбавителя, подходящего для внутривенного введения, с получением фармацевтически приемлемой жидкой композиции; и (f) введения фармацевтически приемлемой жидкой композиции пациенту, где восстановленный раствор, содержащий винкристин, инкапсулированный в липосомы, содержит (i) меньше чем примерно 2,5% свободного винкрестина; и (ii) меньше чем примерно 1,5% N-десформилвинкрестина.

В некоторых вариантах реализации первый раствор, содержащий винкристина сульфат, имеет рН от примерно 4,5 до примерно 4,7. В одном из вариантов реализации первый раствор дополнительно содержит маннит в концентрации примерно 100-200 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации рН второго раствора, содержащего липосомы, составляет примерно 4,0. В одном из вариантов реализации второй раствор дополнительно содержит цитратный буфер.

В некоторых вариантах реализации рН восстанавливаемого раствора повышают путем добавления третьего раствора, содержащего буфер, с рН примерно 9,0. В одном из вариантов реализации третий раствор содержит натрий-фосфатный буфер.

В некоторых вариантах реализации восстанавливаемый раствор имеет отношение концентраций винкрестина сульфата к липиду от примерно 0,1/1,0 до примерно 0,2/2,0.

В некоторых вариантах реализации концентрация винкрестина сульфата в восстановленном растворе составляет от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл. В некоторых вариантах реализации концентрация винкрестина сульфата в восстановленном растворе составляет от примерно 0,15 мг/мл до примерно 0,2 мг/мл. В одном из вариантов реализации концентрация винкрестина сульфата в восстановленном растворе составляет примерно 0,16 мг/мл.

В одном из вариантов реализации первый раствор содержит винкристина сульфат USP (5 мг/5 мл), что эквивалентно 4,5 мг/5 мл винкрестина в форме свободного основания, и 500 мг/5 мл маннита, второй раствор содержит липосомы из сфингомиелина и холестерина, состоящие из 73,5 мг/мл сфингомиелина, 29,5 мг/мл холестерина, 33,6 мг/мл лимонной кислоты, 35,4 мг/мл цитрата натрия, а третий раствор содержит 355 мг/25 мл двухосновного фосфата натрия и 225 мг/25 мл хлорида натрия.

В некоторых вариантах реализации отношение сфингомиелина к холестерину в липосоме составляет от примерно 75/25 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин до 30/50 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин. В некоторых вариантах реализации липосомы содержат от примерно 70/30 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин до 40/45 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин. В одном из вариантов реализации липосомы содержат примерно 55/45 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин. В другом варианте реализации липосомы содержат примерно 60/40 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин.

В некоторых вариантах реализации липосомы имеют размер в диапазоне примерно 0,05-0,5 микрон. В некоторых вариантах реализации липосомы имеют средний диаметр примерно 50-200 нм. В одном из вариантов реализации липосомы имеют средний диаметр примерно 90-125 нм.

В некоторых вариантах реализации восстанавливаемый раствор имеет объем

примерно 20-50 мл. В некоторых вариантах реализации восстанавливаемый раствор имеет объем 30-35 мл.

В некоторых вариантах реализации термостат сухого нагрева уравнивают при $75\pm 2^\circ\text{C}$ в течение примерно 15 минут перед установкой флакона, содержащего восстанавливаемый раствор. В некоторых вариантах реализации восстанавливаемый раствор нагревают в течение примерно 13-15 минут в калиброванной лунке термостата сухого нагрева, уравновешенного при $75\pm 2^\circ\text{C}$. В одном из вариантов реализации восстанавливаемый раствор нагревают в течение 14 минут ± 30 секунд в калиброванной лунке термостата сухого нагрева, уравновешенного при $75\pm 2^\circ\text{C}$.

В некоторых вариантах реализации лунки в термостате меньше чем примерно на 3% превышают среднюю длину или диаметр указанного одного флакона, содержащего восстанавливаемый раствор. В некоторых вариантах реализации флакон, содержащий восстанавливаемый раствор, имеет диаметр от примерно 35,8 до примерно 37,3 мм, и калиброванные лунки в термостате являются цилиндрическими и имеют диаметр от 37,2 до 37,8 мм.

В некоторых вариантах реализации восстановленный раствор уравнивают до комнатной температуры в течение по меньшей мере примерно 30 минут.

В некоторых вариантах реализации объем восстановленного раствора, содержащий дозу винкристина, инкапсулированного в липосомы, для пациента в количестве от примерно 1,5 до примерно 2,4 мг/м², разбавляют с применением стандартных фармацевтических разбавителей, подходящих для внутривенного введения, с получением фармацевтически приемлемой жидкой композиции. В некоторых вариантах реализации объем дозы, рассчитанной для пациента, удаляют из емкости для инфузии и заменяют рассчитанным объемом восстановленного раствора VSLI.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую винкристин, инкапсулированный в липосомы, вводят пациенту в течение не более 24 часов после восстановления.

VSLI, полученный в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, обычно вводят пациенту с раковым заболеванием. В некоторых вариантах реализации раковое заболевание представляет собой лимфому, лейкоз, миелому, рак головного мозга или нейробластому.

В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую винкристин, инкапсулированный в липосомы, вводят при помощи внутривенной инфузии в течение периода примерно от 30 до 60 минут. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую винкристин, инкапсулированный в липосомы, вводят при помощи внутривенной инфузии один раз в 7-28 дней. В одном из вариантов реализации фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую винкристин, инкапсулированный в липосомы, вводят при помощи внутривенной инфузии один раз в 7 дней.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представляет собой график профиля внутреннего нагрева восстановленного раствора, содержащего винкристина сульфат и липосомы из сфингомиелина и холестерина, с применением термостата сухого нагрева и водяной бани.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение устраняет недостатки, связанные с использованием водяной бани в применяемых в настоящее время способах получения VLSI. Неожиданно было установлено, что использование термостата со специально разработанной вставкой,

соответствующей емкости, используемой для восстановления VSLI, обеспечивает профиль нагрева, необходимый для достижения равномерного инкапсулирования винкристина при отсутствии значительного разложения.

Кроме того, важной характеристикой является улучшенная способность способов получения VSLI, описанных в настоящей заявке, продемонстрировать параметрический выпуск. Поскольку для поддержания стабильности VSLI его нужно получать «точно к нужному моменту», способ восстановления фармацевтом должен быть высокоэффективным и воспроизводимым. Фармацевту следует знать (т.е. параметрически), что инкапсулирование проводят при помощи способа, обеспечиваемого нагреванием, поскольку он обеспечивает «систему высвобождения, которая гарантирует, что продукт имеет предполагаемое качество на основании информации, собранной при реализации способа восстановления, и в соответствии с конкретными требованиями GMP, относящимися к параметрическому выпуску» (приложение 17 к рекомендациям ЕС).

Процедура с применением термостата согласно настоящему изобретению обеспечивает удобный и соответствующий требованиям способ восстановления VSLI с эффективностью инкапсулирования более 95%. Поскольку он включает всего несколько стадий, снижается вероятность ошибок при его проведении. Способ в целом является более простым, занимает меньше времени, требует меньшего количества средств и является удобным для обычных рабочих условий аптечного учреждения. Кроме того, при отдельном получении VSLI устраняется возможность загрязнения микробами, растущими в водяной бане или в водяном паре, образующимся на водяной бане с подогревом.

Определения

Если конкретно не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящей заявке, имеют стандартные определения, обычно понятные специалисту в области терапевтических и фармацевтических наук.

Если из контекста явно не следует иное, формы единственного числа включают формы множественного числа.

Термины «содержит» и «содержащий» являются не исключающими и открытыми, т.е. допускают включение дополнительных элементов.

Термин «примерно», в частности в отношении заданной величины или численного значения, охватывает отклонения в плюс или минус пять процентов.

Термин «стерильная» композиция или емкость, применяемый в настоящей заявке, означает отсутствие жизнеспособных микробов, определяемое с применением USP теста на стерильность (см. «The United States Pharmacopoeial Convention», 2008).

Термины «липосома», «везикула» и «липосомальная везикула» означают структуры, имеющие мембраны, содержащие липиды, окружающие водную внутреннюю полость. Если не указано иное, структуры могут иметь одну или более липидных мембран, хотя обычно липосомы имеют только одну мембрану. Такие однослойные липосомы в настоящей заявке называют «моноламеллярными». Многослойные липосомы в настоящей заявке называют «мультиламеллярными».

Термин «стандартный» терапевтический агент или «свободный» терапевтический агент относится к терапевтическому агенту, не инкапсулированному в липосомы. Если не указано иное, обычно полагают, что лекарственное средство является «стандартным» или «свободным». Стандартный алкалоид барвинка в свободной форме может находиться в комбинации с другими реагентами, такими как другие химиотерапевтические соединения, фармацевтический носитель или

комплексообразующие агенты, т.е. термин, применяемый в настоящей заявке, конкретно исключает только липидные составы, содержащие алкалоиды барвинка.

5 Фраза «точно к нужному моменту» относится к объединению отдельных компонентов лекарственного средства (например, VSLI) незадолго (например, в течение 24 часов или меньше) до введения пациенту для сохранения качества лекарственного средства (например, для минимизирования разложения).

Термин «системная доставка», применяемый в настоящей заявке, относится к доставке, обеспечивающей широкое биораспределение соединения в организме. Системная доставка означает, что подходящее для применения, предпочтительно
10 терапевтическое, количество соединения воздействует на большую часть организма. Для обеспечения широкого биораспределения обычно требуется использование способа введения, при котором соединение не разлагается или не выводится слишком быстро (например, в результате пресистемного метаболизма (в печени, легких и т.п.) или за счет быстрого неспецифического связывания с клетками) до достижения очага
15 заболевания. Системную доставку алкалоидов барвинка, инкапсулированных в липосомы, предпочтительно обеспечивают при помощи внутривенной доставки.

Фраза «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства (например, VSLI), эффективного при лечении заболевания или расстройства (например, ракового заболевания) у млекопитающих, например с
20 обеспечением стабилизации заболевания, частичной ремиссии или полной ремиссии ракового заболевания.

Термин «стабилизация заболевания», применяемый в настоящей заявке, относится к состоянию, при котором введение лекарственного средства (например, VSLI) приводит к прекращению роста или распространения опухоли или ракового заболевания,
25 определяемому при помощи стандартных клинических, рентгенологических и/или биохимических исследований, хотя при этом не происходит регрессии или уменьшения размера опухоли или распространения ракового заболевания.

Термины «частичный ответ» или «частичная ремиссия», применяемые в настоящей заявке, относятся к облегчению ракового заболевания, определяемому при помощи
30 стандартных клинических, рентгенологических и/или биохимических исследований, в результате лечения. Как правило, термин «частичный ответ» означает, что размер опухоли или содержание в крови маркеров ракового заболевания в результате лечения снижается относительно начального уровня (например, на 20%, 30%, 40% или 50%). Например, для лечения раковых заболеваний крови ответные реакции оценивают на
35 основе международных экспертных критериев (международные экспертные критерии (IWS); BD Cheson et al. J Clin Oncol 15:4642-4649).

Термины «полный ответ» или «полная ремиссия» означают, что в результате лечения раковое заболевание, оцениваемое на основе, например, размера опухоли и/или содержания маркеров ракового заболевания, не диагностируется.

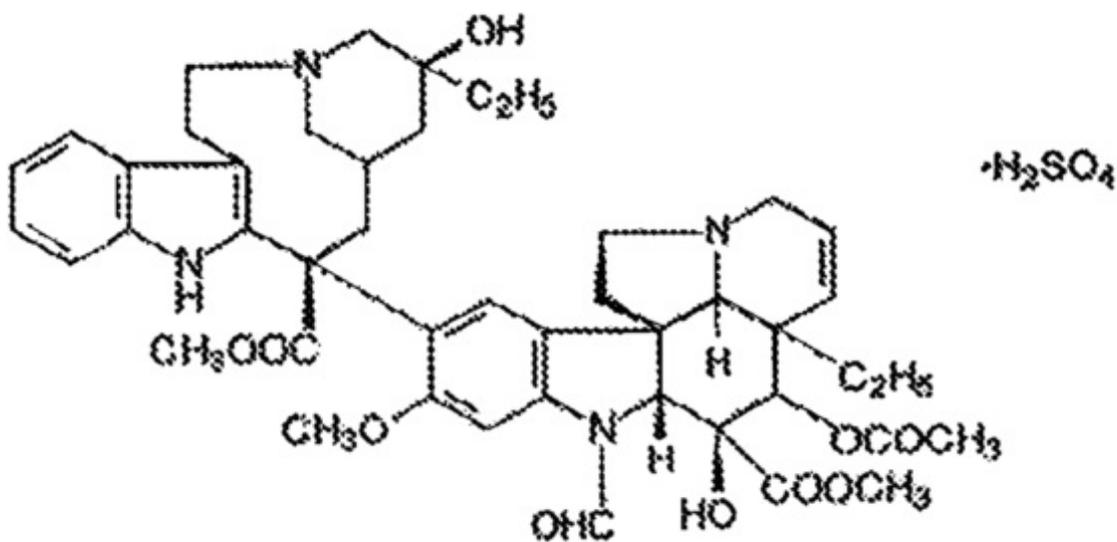
40 «Неврологическая токсичность» включает симптомы невропатии, такие как гипестезия, гиперестезия, парестезия, гипорефлексия, арефлексия, невралгия, гнатодиния, пониженная вибрационная чувствительность, невропатия черепных нервов, илеус, чувство жжения, артралгия, миалгия, мышечный спазм, слабость и/или ортостатическая гипотензия, как перед лечением, так и в процессе лечения. Может наблюдаться
45 ортостатическая гипотензия. Неврологическую токсичность относят к 1-3 степени на основе общих терминологических критериев для нежелательных явлений (СТСАЕ) национального института онкологии (NCI) версии 4.03 (<http://ctep.cancer.gov/reporting/etc.html>).

Винкристина сульфат

Винкристина сульфат является представителем семейства алкалоидов барвинка, впервые полученных из барвинка (*Catharanthus roseus*). Винкристина сульфат обладает специфической противораковой активностью, направленной на клеточный цикл.

Алкалоиды барвинка связываются с тубулином, оказывая влияние на полимеризацию тубулина, в результате чего наблюдаются задержка метафазы, ингибирование митоза клеток и гибели клеток. Терапевтический ответ на его действие в качестве специфического агента, направленного на клеточный цикл, продлевают путем инкапсулирования в липосомы, что позволяет поддерживать повышенный уровень лекарственного средства. Было показано, что пролонгированное воздействие винкристина (и других специфических лекарственных средств, направленных на клеточный цикл) на клетки повышает цитотоксичность *in vitro* лекарственного средства (Bfarris et al. JNCI 84; 1816-1826, 1992; Georgiadis et al, Clin Cancer Res 3:449-454, 1997; Jackson and Bender, Cancer Res 39:4346-4349, 1979).

Винкристина сульфат обычно выделяют в виде 1:1 сульфатной соли. Он представляет собой гигроскопичный белый или слегка желтоватый кристаллический порошок, растворимый в воде. Его молекулярная масса составляет 923,04 (солевая форма)/824,98 (основание), и молекулярная форма представляет собой $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$. Химическим названием винкристина сульфата является 22-оксовинкалейкобластин, и он имеет следующую химическую структуру:



Винкристина сульфат назначают в виде винкристина сульфата для инъекций USP (например, в виде 1 мг/мл раствора), и он также известен как лейрокристина сульфат, киокристин, винкозид, винкрекс, онковин, винкасар PFS®, коммерчески доступные из многих источников.

Липосомы

Липосомальный компонент-носитель согласно настоящему изобретению содержит липосомы из сфингомиелина и холестерина для инъекций (SCLI). Отношение сфингомиелина к холестерину в липосоме может варьировать, но обычно находится в диапазоне от 75/25 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин до 30/50 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин. В одном из вариантов реализации липосомальная композиция содержит от примерно 70/30 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин до 40/45 мол.%/

мол.% сфингомиелин/холестерин. В другом варианте реализации липосомальная композиция содержит примерно 55/45 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин. В другом варианте реализации липосомальные композиции содержат примерно 60/40 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин.

5 В некоторых вариантах реализации в составах могут присутствовать дополнительные липиды, например для предотвращения окисления липидов или для приодинения лигандов к поверхности липосомы. Как правило, включение других липидов приводит к снижению отношения сфингомиелин/холестерин.

Липосомы из сфингомиелина и холестерина, применяемые в настоящем изобретении, 10 могут являться мультиламеллярными или моноламеллярными. Подходящие способы получения липосом включают, но не ограничиваются ими, обработку ультразвуком, экструзию, гомогенизацию под высоким давлением, микрофлюидизацию, детергентный диализ, опосредованное кальцием слияние небольших липосомальных везикул, испарение тонкой пленки и инфузию простого эфира, все из которых хорошо известны в данной 15 области техники. Например, различные способы, подходящие для получения липосом, описаны, например, в, Szoka, et al. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467 (1980), патентах США №№4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028, 4946787, 5543152, 6723338, публикации WO 91/17424, Deamer and Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, 443:629 634 (1976); Fraley, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348 3352 (1979); Hope, et al. 20 *Biochim. Biophys. Acta*, 812:55 65 (1985); Mayer, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 858: 161 168 (1986); Williams, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:242 246 (1988), материале «Liposomes», Marc J. Ostro, ред., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter 1, и Hope, et al. *Chem. Phys. Lip.*, 40:89 (1986), все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

После получения липосом их размер можно доводить до требуемого диапазона 25 размеров с применением стандартных способов, хорошо известных в данной области техники (см., например, патент США №6723338). Обычно липосомы, которые могут быть применены в препаратах VSLI, описанных в настоящей заявке, имеют диапазон размеров примерно 0,05-0,5 микрона (50-500 нм), 0,2-0,4 микрона (200-400 нм), примерно 0,1-0,4 микрона (100-400 нм), примерно 0,05-0,2 (50-200 нм) или от примерно 0,5 (500 30 нм) до примерно 0,15 микрона (150 нм). В некоторых вариантах реализации липосомы представляют собой частицы со средним диаметром примерно 50 нм, примерно 60 нм, примерно 70 нм, примерно 80 нм, примерно 90 нм, примерно 100 нм, примерно 105 нм, примерно 110 нм, примерно 115 нм, примерно 120 нм, примерно 130 нм, примерно 140 нм, примерно 150 нм, примерно 160 нм, 170 нм, примерно 180 нм, примерно 190 нм или 35 примерно 200 нм. В одном из вариантов реализации средний размер частиц составляет от 90 до 125 нм с предпочтительным средним размером частиц примерно 107,5 нм, где 25% частиц имеют диаметр не меньше 70 нм, и 90% частиц имеют диаметр не больше 170 нм.

Липосомы из сфингомиелина и холестерина выступают в качестве липосомального 40 компонента, применяемого в препаратах VSLI, описанных в настоящей заявке, и получают таким образом, чтобы внутренняя полость липосомы имела низкий pH. В процессе восстановления VSI, имеющий низкий pH, и SPLI, имеющий низкий pH, разбавляют в буфере с более высоким pH, в результате чего конечный pH внешнего раствора VSLI является примерно физиологически нейтральным. В результате образуется 45 градиент pH через липидную мембрану, при котором pH внутреннего ядра липосомы ниже, чем pH внешнего окружающего раствора. Указанный градиент получают в соответствии с известными способами (например, патент США №6723338). Например, градиент может быть достигнут путем приготовления состава липосом в присутствии

буфера с рН от примерно 2 до примерно 6, рН от примерно 3 до примерно 5, с последующим переносом липосом в среду с более высоким рН, например от примерно 7,0 до примерно 7,5. В одном из вариантов реализации липосомы имеют внутренний рН примерно 4,0. Можно использовать любые буферы для разбавления, например фосфат натрия. В одном из вариантов реализации буфер имеет рН 8-10, предпочтительно 9,0, в результате чего конечный разбавленный внешний липосомальный раствор после смешивания с VSI и SPLI имеет физиологически нейтральный рН.

Перед использованием для получения VSLI в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, SPLI липосомы можно хранить при температуре охлаждения в течение длительного времени перед инкапсулированием лекарственного средства и восстановлением VSLI для введения пациенту. Альтернативно, липосомы можно дегидрировать, хранить, а затем восстанавливать перед применением в соответствии с хорошо известными способами (см., например, патенты США №№5077056 или 5736155).

Получение VSLI

VSLI получают при помощи строгих асептических способов, например в боксе биологической безопасности или с применением установленных фармацевтических правил обеспечения безопасности при получении стерильных инъеклируемых составов и опасных лекарственных средств. Следует строго соблюдать способы обработки и утилизации противораковых лекарственных средств (NIOSH Alert: Preventing occupational exposure to antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings. 2004. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH) Publication No. 2004-16; OSHA Technical Manual, TED 1-0.15A, Section VI: Chapter 2. Controlling Occupational Exposure to Hazardous Drugs. OSHA, 1999; American Society of Health-System Pharmacists. ASHP guidelines on handling hazardous drugs. Am J Health-Syst Pharm. (2006) 63:1172-1193; Polovich M, White JM, Kelleher LO (eds.) 2005. Chemotherapy and biotherapy guidelines and recommendations for practice (2nd. ed.) Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society).

Способ получения восстановленного VSLI включает следующие общие стадии:

- Восстанавливаемый раствор получают путем смешивания в стерильной емкости первого раствора винкристина сульфата, содержащего примерно 1 мг/мл, примерно 2 мг/мл или примерно 5 мг/мл винкристина сульфата в буфере, содержащем от примерно 100 до примерно 200 мг/мл маннита (также можно использовать другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, в которых винкристина сульфат остается стабильным), с рН от примерно 3,5 до примерно 5,5 или от примерно 4,5 до примерно 4,7, со вторым раствором липосом, суспендированных в буфере, с низким рН (например, примерно 4,0) при соответствующем отношении концентраций, например от 0,1/1,0 до 0,2/1,0 (массы винкристина сульфата к массе липида).

- Затем рН восстанавливаемого раствора, содержащего винкристина сульфат и липосомы, повышают до значения из диапазона от примерно 7,0 до примерно 7,5 с получением градиента рН. Такое увеличение может быть достигнуто, например, путем добавления буфера (например, фосфата натрия) с более высоким рН (например, примерно 9,0).

- Затем восстанавливаемый раствор нагревают в течение по меньшей мере от примерно 13 до примерно 18 минут в термостате сухого нагрева, уравновешенном при примерно 75°C, содержащем калиброванные лунки, размер которых не более чем примерно на 5% превышает среднюю длину или диаметр емкости, содержащей восстанавливаемый раствор, с получением восстановленного продукта VSLI.

- Затем нагретый восстанавливаемый раствор, содержащий восстановленный продукт, оставляют для уравнивания в течение по меньшей мере примерно 30 минут, по меньшей мере примерно 45 минут или по меньшей мере примерно 60 минут до комнатной температуры (от 15°C до 30°C).

5 - Затем объем восстанавливаемого раствора, соответствующий дозе восстановленного VSLI, предназначенного для введения пациенту, смешивают с раствором, подходящим для внутривенного введения в конечном объеме примерно 100 мл.

В некоторых вариантах реализации растворы винкристина сульфата, липосом и буфера с высоким рН обеспечивают в трех отдельных емкостях. В некоторых вариантах
10 реализации указанные три раствора смешивают в одной стерильной емкости объемом, достаточным для вмещения общего объема растворов, например примерно 20-50 мл, примерно 25-40 мл или примерно 30-35 мл.

В одном из вариантов реализации отдельные компоненты представлены в виде набора, включающего 3 или более флаконов. По меньшей мере один из флаконов
15 содержит раствор винкристина, содержащего, например, 1 мг/мл, 2 мг/мл или 5 мг/мл винкристина сульфата в буфере, содержащем, например, 100 или 200 мг/мл маннита (также можно использовать другие вспомогательные вещества, которые являются фармацевтически приемлемыми и в которых винкрисдин остается стабильным в течение
20 длительного времени), с рН, доведенным до 3,5-5,5 или предпочтительно 4,5-4,7. Один из флаконов содержит раствор, содержащий липосомы из сфингомиелина и холестерина, суспендированные в 300 мМ нитратном буфере, например, при рН 4,0. Другой флакон или флаконы содержат щелочно-фосфатный буфер (например, с рН 9,0), такой как двухосновный фосфат натрия, 14,2 мг/мл (20 мл/флакон).

В одном из вариантов реализации ингредиенты для восстановления VSLI
25 представлены отдельно в трех флаконах, содержащих (i) винкристина сульфат USP (5 мг/5 мл), что эквивалентно 4,5 мг/5 мл винкристина в форме свободного основания, и 500 мг/5 мл маннита; (ii) липосомы из сфингомиелина и холестерина для инъекций (SPLI), состоящие из 73,5 мг/мл сфингомиелина, 29,5 мг/мл холестерина, 33,6 мг/мл лимонной кислоты, 35,4 мг/мл цитрата натрия и не больше чем 0,1% этанола; и (iii)
30 фосфат натрия для инъекций (SPI), содержащий 355 мг/25 мл двухосновного фосфата натрия и 225 мг/25 мл хлорида натрия, все из которых получены с применением воды для инъекций.

Емкости, используемые в способах согласно настоящему изобретению, являются стерильными и состоят из любого из фармацевтически приемлемых веществ (например,
35 стекла или пластика). Существует ряд различных типов и размеров флаконов, коммерчески реализуемых множеством различных производителей (например, Wheaton Products, Thomas Scientific). В одном из вариантов реализации компоненты готовят в стерильном флаконе со средним диаметром примерно 36,5 мм и со средним диапазоном от примерно 35,8 до примерно 37,3 мм.

40 Подходящие термостаты сухого нагрева, которые обеспечивают безопасный и сухой источник постоянной температуры, коммерчески доступны из множества источников (например, Bibby Scientific Ltd, V&P Scientific, Inc., Fisher Scientific Inc., VWR Scientific, Thermolyne Inc.). Теплопроводящие вставки, содержащие одну или более калиброванных лунок, разработанных под емкость с восстанавливаемым раствором, могут представлять собой металл (например, анодированный алюминий, медь) или другие подходящие
45 теплопроводные материалы. Вставки, содержащие лунки соответствующего размера, могут быть легко приобретены (например, V&P Scientific, Inc.) или произведены с применением стандартных способов. В некоторых вариантах реализации термостат

имеет отверстия, которые примерно на 1-5% или примерно на 4,5%, 4,2%, 4,0%, 3,8%, 3,5%, 3,3%, 3,0%, 2,8%, 2,5%, 2,2%, 2,0%, 1,8%, 1,5%, 1,2% или 1,0% превышают среднюю длину или диаметр емкости, содержащей восстанавливаемый раствор. В некоторых вариантах реализации термостат имеет цилиндрические отверстия. В одном из вариантов реализации отверстия имеют диаметр от 37,2 до 37,8 мм или от примерно 37,4 до 37,6 мм.

В некоторых вариантах реализации восстанавливаемый раствор нагревают в течение примерно 13 минут, примерно 14 минут, примерно 15 минут, примерно 16 минут, примерно 17 минут при примерно 75°C. В одном из вариантов реализации восстанавливаемый раствор нагревают в течение примерно 14 минут в термостате, уравновешенном при 75°C.

Восстановленный VSLI может быть смешан с фармацевтически приемлемым разбавителем, подходящим для внутривенного введения пациенту (например, декстроза, хлорид натрия), который может находиться, например, в предварительно заполненной стерильной емкости (стеклянная бутылка, пластиковая бутылка или пластиковый мешок). В некоторых вариантах реализации из мешка для инфузии выводят объем дозы, рассчитанной для пациента, и заменяют его рассчитанным объемом восстановленного раствора VSLI, например, чтобы конечный объем емкости для инфузии составлял 100 мл. В одном из вариантов реализации фармацевтически приемлемые разбавители представляют собой 5% раствор декстрозы для инъекции или 0,9% раствор хлорида натрия для инъекции.

VSLI

VSLI, полученный в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, представляет собой белую или беловатую полупрозрачную суспензию, по существу, не содержащую видимых посторонних веществ и агрегатов. Как правило, больше чем примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или более винкристина сульфата инкапсулировано в липосомы.

VSLI, полученный в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, имеет общее содержание примесей меньше чем примерно 4,0%, 3,5%, 3,4%, 3,2%, 3,1% или 3,0%. В некоторых вариантах реализации VSLI содержит меньше чем примерно 2,0%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4% или 1,3% N-десформилвинкристина.

VSLI, полученный в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, имеет среднюю скорость высвобождения *in vitro* (IVR) или скорость высвобождения *in vivo* по меньшей мере примерно 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84% или примерно 85% за 72 часа.

Исследования для определения степени инкапсулирования винкристина, содержания примесей и скоростей высвобождения винкристина из липосом известны в данной области техники. См., например, патенты США №№5543152 и 5837282; Zhigalstev et al. J. Controlled Release 104:103-111, 2005; Puscatau et al. Am. J. Health-Syst. Pharm. 62:1606-1612, 2005.

Как правило, VSLI, полученный в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, содержит от примерно 0,1 мг/мл до примерно 0,5 мг/мл винкристина сульфата. В некоторых вариантах реализации винкристина сульфат содержится в концентрации от примерно 0,15 мг/мл до примерно 0,2 мг/мл. В одном из вариантов реализации винкристина сульфат содержится в концентрации примерно 0,16 мг/мл. В одном из вариантов реализации VSLI содержит 5 мг винкристина сульфата, 500 мг маннита, 73,5 мг сфингомиелина, 29,5 мг холестерина, 36 мг цитрата натрия, 38 мг лимонной кислоты, 355 мг фосфата натрия и 225 мг хлорида натрия.

Дозировка и способ введения

VSLI, полученный в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, может быть использован для лечения любого вида раковых заболеваний, включая первичные, рецидивирующие и рефрактерные раковые заболевания. Пациент или субъект, подвергающийся лечению с применением VLSI, может представлять собой различных животных, включая людей, нечеловекообразных приматов, птиц, лошадей, собак, кошек, жвачных животных, свиней, зайцеобразных, грызунов и т.п. В некоторых вариантах реализации VSLI используют для лечения раковых заболеваний крови и лимфатической системы, включая, но не ограничиваясь ими, лимфомы, лейкозы и миеломы. В некоторых вариантах реализации VSLI используют для лечения опухолей, включая, но не ограничиваясь ими, нейробластомы и рак головного мозга.

VSLI может быть использован в качестве единственного агента или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами, такими как циклофосфамид, доксорубин и/или преднизон. В одном из вариантов реализации VSLI вводят совместно с циклофосфамидом, доксорубицином и преднизоном в виде липосомального CHOP состава («липо-CHOP»). В другом варианте реализации VSLI вводят совместно с по меньшей мере одним дополнительным противоопухолевым агентом. В другом варианте реализации дополнительный противоопухолевый агент представляет собой противоопухолевое моноклональное антитело, такое как OncolyTM, RituxanTM или ВехарTM. В другом варианте реализации дополнительный противоопухолевый агент представляет собой антисмысловые лекарственные средства или противоопухолевую вакцину. В другом варианте реализации VSLI вводят совместно с агентами для профилактического или терапевтического лечения нейротоксичности, таким как габапентин (NeurontinTM).

Как правило, VSLI готовят в течение примерно 24 часов перед введением пациенту и хранят при комнатной температуре (от 15°C до 30°C) или при охлаждении (2-8°C).

VSLI вводят пациенту системно при помощи внутривенной доставки. В одном из вариантов реализации VSLI вводят при помощи внутривенной инфузии в течение, например, примерно 30 минут, примерно 45 минут, примерно 60 минут, примерно 90 минут или дольше.

Как правило, VSLI вводят периодически, например один раз в 7-28 дней. В некоторых вариантах реализации VSLI вводят один раз в 3, 5, 7, 10, 14, 21 или 28 дней. В одном из вариантов реализации VSLI вводят при помощи внутривенной инфузии раз в 14 дней. В другом варианте реализации VSLI вводят при помощи внутривенной инфузии раз в 7 дней. В настоящей заявке каждое из введений VSLI считают одним «курсом» лечения.

Количество VSLI, вводимого с одной дозой, зависит от ряда факторов, таких как история болезни пациента, использование других видов терапии и характера заболевания (например, первичное, рецидивирующее или рефрактерное раковое заболевание). Как правило, VSLI, полученный в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, вводят в дозировке от примерно 1,4 до примерно 2,4 мг/м². В некоторых вариантах реализации VSLI вводят в дозе примерно 1,5 мг/м², примерно 1,8 мг/м², примерно 2,0 мг/м², 2,1 мг/м², 2,2 мг/м², 2,3 мг/м² или 2,4 мг/м² (т.е. мг винкристина на м² площади поверхности тела). В одном из вариантов реализации VSLI вводят в дозе 2,25 мг/м² при помощи внутривенной инфузии в течение примерно 60 минут один раз в 7 дней.

В других вариантах реализации дозирование VSLI может быть временно приостановлено и/или доза может быть снижена в процессе лечения. Например, в одном

из вариантов реализации введение VSLI пациенту с периферической невропатией 3 степени или персистирующей периферической невропатией 2 степени можно прекращать на срок до примерно 7 дней, а после снижения тяжести до 1 или 2 степени продолжать с пониженной дозировкой примерно 2 мг/м². В другом варианте реализации введение

5 пациенту с персистирующей периферической невропатией 2 степени, даже после получения сниженной дозы, можно прекращать на срок примерно до 7 дней, а затем продолжать с дозировкой 1,825 мг/м² или 1,5 мг/м².

Дозировку VSLI определяют путем вычисления площади поверхности тела (ППТ) субъекта в соответствии с хорошо известными способами. Например, в соответствии с формулой Мостеллера, в которой ППТ равняется квадратному корню произведения массы субъекта в кг и высоты в см, деленного на 3600. «Нормальное значение» ППТ для человека обычно составляет 1,7 м² и оно также зависит от других факторов, включая возраст и пол конкретного человека. Например:

15 - Среднее значение ППТ для взрослого мужчины: 1,9 м²

- Среднее значение ППТ для взрослой женщины: 1,6 м²

- Среднее значение ППТ для ребенка (9 лет): 1,07 м²

- Среднее значение ППТ для ребенка (10 лет): 1,14 м²

20 - Среднее значение ППТ для ребенка (12-13 лет): 1,33 м²

(Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. N Engl J Med 1987; 317:1098)

ПРИМЕРЫ

Пример 1

25 Температурный профиль раствора VSLI во флаконе исследовали при нагревании в термостате сухого нагрева и сравнивали с температурным профилем, наблюдаемым при нагревании на водяной бане в соответствии с утвержденными инструкциями, указанными для Marqibo[®] (ID ссылки в FDA/cder: 3172211, август 2012).

Оборудование и материалы

30 - набор восстановленного VSLI Marqibo[®], кат. № NT 268035 (содержимое частично использованных флаконов объединяют в одном флаконе)

- термостат Techne Dri-block[®] DB-3, снабженный лункой с диаметром 37,59 мм (1,480") и карманом для термометра (Bibby Scientific Limited)

35 - цифровые термометры; с точностью ±1°C в диапазоне 0°-100°C

- водяная баня Isotemp 202 #00947 (Fisher Scientific)

- калибратор температуры с термопарой Fluke 726 #914002 (Fluke Corporation)

Процедура

40 Температурный профиль измерений получали путем регистрации температуры раствора во флаконе после помещения в нагревательное устройство (т.е. термостат сухого нагрева или водяная баня). Началом отсчета является момент помещения флакона в нагревательное устройство. Использовали следующий порядок операций:

1. Компоненты, VSI и SCLI, объединяли в одном флаконе SPI (Swiss Precision Instruments, Inc.). Цифровую термопару вставляли через септу флакона, закрепляли примерно в 5 мм от нижней поверхности флакона и располагали в центре жидкого

45 раствора.

2. Использовали термостат сухого нагрева с блоком, имеющим 37,6 мм (1,480 дюйма) отверстие для флакона. Температуру блока контролировали при помощи установки термометра в отверстие для термометра, которое находится рядом с отверстием для

флакона. Температуру термостата устанавливали равной 75°C и термостат нагревали до получения показаний термометра $75\pm 2^{\circ}\text{C}$. Термостат уравнивали в течение по меньшей мере 15 минут при $75\pm 2^{\circ}\text{C}$. Затем флакон размещали в лунке термостата, уравниваемого при $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, на 14 минут ± 15 секунд, а затем доставали. Флакон с восстановленным раствором охлаждали до температуры окружающей среды путем выдерживания в условиях окружающей среды в течение примерно 60 минут. Процедуру повторяли два раза с использованием того же флакона.

3. Температуру жидкости внутри флакона и температуру термостата записывали с интервалом в 1 минуту (или как указано) и свели в таблицу 1.

4. Для сравнения водяную баню нагревали до получения температуры воды $65\pm 5^{\circ}\text{C}$. Водяную баню уравнивали в течение по меньшей мере 15 минут. Затем флакон, содержащий восстановленный VSLI, выдерживали на водяной бане в течение 10 минут ± 1 минута, а затем доставали. Флакон с восстановленным раствором оставляли для охлаждения до температуры окружающей среды.

5. Температуру жидкости внутри флакона и температуру воды записывали и свели в таблицу 1.

Результаты и обсуждение

Температурный профиль нагрева жидкого содержимого флакона с восстановленным VSLI с применением термостата сухого нагрева, уравниваемого при $75\pm 2^{\circ}\text{C}$, демонстрирует равномерную и постепенную скорость нагрева до $65\pm 5^{\circ}\text{C}$. Результаты, приведенные в таблице 1 и на фигуре 1, демонстрируют, что термостат сухого нагрева нагревал жидкое содержимое флакона со средней скоростью $3,26^{\circ}\text{C}/\text{минута}$, при этом водяная баня нагревает содержимое флакона со средней скоростью $4,21^{\circ}\text{C}/\text{минута}$. Требуемую температуру $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ достигали за 14 минут в термостате сухого нагрева и за 10 минут на водяной бане. Для обоих нагревательных устройств наблюдали постепенное охлаждение флакона после удаления из источника нагрева. Температура сохранялась в диапазоне $59-65^{\circ}\text{C}$ в течение 3-4 минут после удаления из термостата сухого нагрева и 1-2 минут после снятия с водяной бани. Флакон находился при $50-65^{\circ}\text{C}$ в течение по меньшей мере 20 минут в случае термостата сухого нагрева и 15 минут в случае водяной бани. После нагревания с применением любого из устройств растворы оставались визуально идентичными: белая или беловатая полупрозрачная суспензия, по существу, не содержащая видимых посторонних веществ и агрегатов.

Таблица 1. Температурный профиль восстановления*

Время	Внутренняя температура НВ	Темп. термостат а	Внутренняя температура НВ	Темп. термостата 2	Внутренняя температура WB	Водяная баня
0	20,3	75,3	22,8	75,4	20,9	63,8
1	25,6	74,7	29,9	74,8	35,4	63,8
2	31,6	74,0	36,1	74,0	45,6	63,9

	3	37,0	73,5	41,3	73,6	51,7	63,4
	4	41,9	73,3	45,5	73,4	56,1	63,7
	5	46,2	73,2	49,1	73,4	58,8	63,6
5	6	49,8	73,2	52,4	73,4	60,3	64,0
	7	53,0	73,3	55,2	73,4	61,3	64,4
	8	55,6	73,4	57,5	73,5	62,2	64,0
	9	57,9	73,6	59,7	73,8	62,7	63,8
	10	60,8	73,8	61,4	73,9	63,0	63,8
	11	62,1	73,9	62,8	74,1	59,0	NR
10	12	63,3	74,1	64,4	74,2	56,6	NR
	13	64,6	74,1	65,4	74,3	54,8	NR
	14	65,8	74,3	66,4	74,4	53,1	NR
	15	65,6	NR	66,1	NR	52,0	NR
	16	64,1	NR	63,7	NR	51,2	NR
	17	62,7	NR	NR	NR	50,3	NR
15	18	61,2	NR	60,6	NR	49,3	NR
	19	59,8	NR	59,3	NR	48,7	NR
	20	58,6	NR	58,0	NR	48,0	NR
	21	57,4	NR	56,5	NR	NR	NR
	22	56,1	NR	55,3	NR	NR	NR
	23	55,0	NR	54,2	NR	NR	NR
20	24	53,9	NR	53,2	NR	NR	NR
	25	52,8	NR	NR	NR	44,4	NR
	26	51,7	NR	NR	NR	NR	NR
	27	50,8	NR	NR	NR	NR	NR
	28	49,8	NR	NR	NR	NR	NR
		NR	NR	NR	NR	NR	NR
25	33	45,6	NR	NR	NR	NR	NR
	38	42,3	NR	NR	NR	NR	NR
	43	39,4	NR	NR	NR	NR	NR
	48	37,3	NR	NR	NR	NR	NR
	53	35,3	NR	NR	NR	NR	NR
30	58	33,9	NR	NR	NR	NR	NR
	60	33,3	NR	NR	NR	NR	NR

*Внутренняя темп. НВ = температура содержимого внутри флакона, нагреваемого в термостате сухого нагрева

Внутренняя темп. WB = температура содержимого внутри флакона, нагреваемого на водяной бане

NR = не записывали

Вывод

Указанное исследование продемонстрировало, что термостат сухого нагрева обеспечивает подходящий температурный профиль нагрева, позволяющий достигать температуры жидкости внутри флакона с VSLI $65\pm 5^\circ\text{C}$ за 14 минут, и обеспечивает поддержание температуры в диапазоне $50-65^\circ\text{C}$ в течение 20 минут. Это сопоставимо с нагреванием флаконов на водяной бане, которое позволяет достигать температуры внутри жидкости $65\pm 5^\circ\text{C}$ за 10 минут и обеспечивает поддержание температуры в диапазоне $50-65^\circ\text{C}$ в течение 15 минут. Скорость нагрева в обоих способах является постепенной и равномерной. Термостат сухого нагрева с температурой $75\pm 2^\circ\text{C}$ обеспечивает скорость нагрева $3,26^\circ\text{C}$ в минуту, и водяная баня с температурой $65\pm 5^\circ\text{C}$ обеспечивает скорость нагрева $4,21^\circ\text{C}$ в минуту. На водяной бане скорость нагрева

снижалась, тогда как при нагревании в термостате сухого нагрева температура продолжала расти с постоянной скоростью до температуры термостата $75\pm 2^\circ\text{C}$. Для охлаждения флаконов после удаления их из нагревательных устройств до температуры окружающей среды потребовалось примерно 60 минут. Указанные профили нагрева свидетельствуют о том, что почти количественное инкапсулирование винкристина является термодинамическим процессом, который зависит от общего времени воздействия температур, которые способствуют мембранному инкапсулированию, а не от кинетики достижения указанных условий.

Таким образом, термостат сухого нагрева и водяная баня способны обеспечивать термодинамический профиль, позволяющий проводить инкапсулирование винкристина в липосомы из сфингомиелина и холестерина для эффективного получения VSLI.

Пример 2

Исследовали содержание продуктов разложения винкристина в VSLI, восстановленным с применением термостата сухого нагрева.

Оборудование и материалы:

- термостат Techne Dri-block[®] DB-3, снабженный лункой с диаметром 37,59 мм (1,480") и карманом для термометра
- термометр с диаметром не больше чем 7 мм; с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$ в диапазоне $0-100^\circ\text{C}$
- калиброванный секундомер или таймер
- микрометр (0-2") или эквивалент
- 30 наборов Marqibo[®], кат. # ТТХ0611 (Talon Therapeutics, Inc.)

Процедура

В исследовании использовали флаконы с максимальным и минимальным наружным диаметром из 30 наборов Marqibo[®], включающих флаконы SPI. Диаметр флаконов SPI измеряли и записывали с точностью до 0,0025 мм (0,001"). Результаты приведены в таблице 2.

30

35

40

45

Таблица 2. Номера и диаметры флаконов SPI

Номер флакона	Диаметр флакона SPI ($\pm 0,00025$ мм)	Номер исследования
1	1,4350	
2	1,4360	
3	1,4340	
4	1,4350	
5	1,4490	
6	1,4455	
7	1,4330	
8	1,4370	
9	1,4350	
10	1,4315	
11	1,4405	
12	1,4545	набор 2
13	1,4335	
14	1,4370	
15	1,4430	
16	1,4380	
17	1,4345	
18	1,4305	набор 1
19	1,4330	
20	1,4455	
21	1,4360	
22	1,4325	
23	1,4425	
24	1,4465	
25	1,4475	
26	1,4325	
27	1,4420	
28	1,4440	
29	1,4315	
30	1,4330	

Для восстановления выбрали два флакона. Флакон, имеющий диаметр, наиболее близкий или равный 35,81 мм (1,41 дюйма) («флакон 1»), что является нижней границей допустимого диаметра для флакона SPI, имел измеренный диаметр 36,3347 мм (1,4305 дюйма). Флакон, имеющий диаметр наиболее близкий или равный 37,34 мм (1,47 дюйма) («флакон 2»), что является верхней границей допустимого диаметра для флакона SPI, имел измеренный диаметр 36,9443 мм (1,4545 дюйма).

Выбранные наборы восстанавливали, как описано выше, и исследовали на содержание винкристина сульфата, родственных соединений, а также размер и распределение частиц в соответствии с адаптированными способами для винкристина сульфата для инъекций USP.

Наборы для двух исследований восстанавливали с применением вышеописанных инструкций за исключением того, что вместо водяной бани использовали термостат сухого нагрева с блоком, имеющим 37,6 мм (1,480 дюйма) отверстие для флакона. Температуру блока контролировали при помощи установки термометра в отверстие для термометра, которое находится рядом с отверстием для флакона. Температуру термостата устанавливали равной 75°C и термостат нагревали до получения показаний термометра 75 \pm 2°C. Затем термостат уравнивали в течение по меньшей мере 15 минут (время записывали). Условия указаны в таблице 3. Затем каждый флакон

размещали в термостате при $75 \pm 2^\circ\text{C}$ на 14 минут ± 15 секунд (время записывали), а затем доставали и оставляли охлаждаться до температуры окружающей среды путем выдерживания флакона в условиях окружающей среды в течение примерно 60 минут.

В процессе восстановления записывали время и температуру термостата, и данные представлены в таблице 4. Результаты анализа представлены в таблицах 5, 6 и 7.

Таблица 3. Уравновешивание температуры термостата сухого нагрева

	Время	Время между последовательными показаниями
Термостат сухого нагрева при 75°C	8:35 AM	
Первое полученное значение термометра $75 \pm 2^\circ\text{C}$	8:46 AM	$73,0^\circ\text{C}$
Уравновешивание в течение 15 минут	9:01 AM	$75,2^\circ\text{C}$

Таблица 4. Параметры восстановления для термостата сухого нагрева

ID флакона	Диаметр флакона SPI	Темп. T=0 мин	Темп. T=1 мин	Темп. T=5 мин	Темп. T=14 мин	Время при удалении 14 мин \pm 15 с
		$75 \pm 1^\circ\text{C}$	Для инф.	Для инф.	$75 \pm 1^\circ\text{C}$	
12	1,4545	$75,2^\circ\text{C}$	$74,5^\circ\text{C}$	$73,2^\circ\text{C}$	$74,2^\circ\text{C}$	9:24 AM
18	1,4305	$75,2^\circ\text{C}$	$74,6^\circ\text{C}$	$73,2^\circ\text{C}$	$74,3^\circ\text{C}$	10:02 AM

Таблица 5. Общий и свободный винкристин

ID набора	Общий винкристин
Набор 1	102,10%
Набор 2	102,14%

Таблица 6. Родственные соединения

ID набора	N-десформилвинкристин	Любые другие соединения
Набор 1	1,314	0,572
Набор 2	1,345	0,574

Таблица 7. Распределение частиц по размерам

ID набора	Средний диаметр	D ₂₅	D ₉₀
Набор 1	108 нм	90 нм	139 нм
Набор 2	107 нм	91 нм	138 нм

Результаты и обсуждение

Восстановление VSLI проводили с применением флаконов для восстановления с диаметром 36,3347 и 36,9443 мм (1,4305 и 1,4545 дюйма) с применением термостата сухого нагрева. Указанные флаконы имеют диаметр, наиболее близкий к нижней границе, 35,81 мм (1,41 дюйма), и верхней границе, 37,34 мм (1,47 дюйма), допустимых диаметров. В процессе инкубирования флаконов с VSLI в термостате в течение 14 минут

температура термостата отклонялась не больше чем на 1 градус благодаря температурному равновесию в зазоре, образованном за счет разницы между диаметром лунки термостата и диаметром флаконов. Указанная кинетика теплообмена не влияла на получение VSLI. После выдерживания в термостате сухого нагрева, уравновешенного при 75°C, в течение 14 минут полученный восстановленный VSLI в обоих флаконах демонстрировал больше чем 97% инкапсулирования винкристина. В результате инкубирования с применением термостата сухого нагрева достигали эффективности инкапсулирования, соответствующей в среднем 2,175% свободного винкристина. В случае профиля нагрева с применением термостата сухого нагрева не наблюдали образования новых примесей или увеличения содержания примесей. Содержание главного продукта разложения, N-десформилвинкристина, составляло в среднем 1,33%, содержание каждой из других примесей составляло не больше чем 0,574% и общее содержание примесей составляло не больше чем 3,10%. Распределение частиц по размерам соответствовало спецификации VSLI со средним диаметром 107,5 нм, средним D₂₅ 90,5 нм и D₉₀ 138,5 нм, при этом VSLI, полученный при помощи нагревания в термостате сухого нагрева, высвобождал примерно 84 процента винкристина в течение 72 часов, что определяли при помощи IVR исследования.

Таким образом, VSLI, восстановленный с применением термостата сухого нагрева, уравновешенного при 75±2°C, при инкубировании в течение 14 минут ±15 секунд демонстрировал инкапсулирование больше чем 99% винкристина в липосомы из сфингомиелина и холестерина, и в процессе указанного эксперимента не наблюдали никаких отклонений. Полученные данные обеспечивают температурный профиль восстановления с применением термостата сухого нагрева, который позволяет получить продукт с эффективным инкапсулированием винкристина, и демонстрируют, что термостат сухого нагрева может быть использован вместо водяной бани при восстановлении VSLI.

Пример 3

В указанном исследовании измеряли содержание продуктов разложения винкристина для определения диапазона времен восстановления с применением термостата сухого нагрева.

Оборудование и материалы

- термостат Dri-block[®], снабженный лункой с диаметром 37,490 мм (±0,102) (1,476" (±0,004)) и карманом для термометра
- термометр с диаметром не больше чем 7 мм, с точностью ±1°C в диапазоне 0-100°C
- калиброванный секундомер или таймер
- наборы Marqibo[®], кат. # ТТХ0611 (Talon Therapeutics, Inc.)

Процедура

Случайным образом выбирали три набора Marqibo[®] и восстанавливали путем нагревания в термостате сухого нагрева в течение трех различных периодов времени (13, 14 и 15 минут соответственно) при 75°C. Флаконы с восстановленным раствором исследовали на общий и свободный винкристина сульфат, родственные соединения, а также размер и распределение частиц с применением адаптированных способов для винкристина сульфата для инъекций USP.

Наборы для исследований восстанавливали с применением вышеописанных инструкций за исключением того, что вместо водяной бани использовали термостат Dri-Block[®] с блоком, имеющим 37,490 мм (±0,102 мм) (1,476 дюйма (±0,004")) отверстие для флакона. Температуру блока контролировали при помощи установки термометра

в отверстие для термометра, которое находится рядом с отверстием для флакона. Температуру термостата устанавливали равной 75°C и термостат нагревали до получения показаний термометра 75±2°C. Затем термостат уравнивали в течение по меньшей мере 15 минут. Условия указаны в таблице 9. Затем каждый флакон выдерживали в термостате при 75±2°C в течение 13 минут ±15 секунд, 14 минут ±15 секунд и 15 минут ±15 секунд соответственно. Затем флаконы доставали и помещали в условия окружающей среды. Перед проведением исследования флаконы с восстановленным раствором охлаждали до температуры окружающей среды в течение по меньшей мере 60 минут.

В процессе восстановления время и температуру термостата записывали, данные представлены в таблицах 9 и 10. Результаты анализа представлены в таблицах 11, 12 и 13.

Таблица 9а. Уравнивание температуры термостата сухого нагрева (флакон 1)

	Время	Время между последовательными показаниями
Термостат сухого нагрева при 75°C	8:20 AM	
Первое полученное значение термометра 75 ± 2°C	8:48 AM	Н/Д
Уравнивание в течение 15 минут*	9:03 AM	15 мин

* Температура в конце 15-минутного периода уравнивания: 75,2°C

Таблица 9б. Уравнивание температуры термостата сухого нагрева (флакон 2)

	Время	Время между последовательными показаниями
Термостат сухого нагрева при 75°C	9:17 AM	
Первое полученное значение термометра 75 ± 2°C	9:17 AM	Н/Д
Уравнивание в течение 15 минут*	9:32 AM	15 мин

* Температура в конце 15-минутного периода уравнивания: 75,2°C

Таблица 9с. Уравнивание температуры термостата сухого нагрева (флакон 2)

	Время	Время между последовательными показаниями
Термостат сухого нагрева при 75°C	9:47 AM	
Первое полученное значение термометра 75 ± 2°C	9:47 AM	Н/Д
Уравнивание в течение 15 минут*	10:02 AM	15 мин

* Температура в конце 15-минутного периода уравнивания: 75,1°C

Таблица 10. Параметры восстановления для термостата сухого нагрева

Флаконт	Диаметр флакона SPI	Темп. T=0 мин	Темп. T=1 мин	Темп. T=5 мин	Темп. T=13 мин	Темп. T=14 мин	Темп. T=15 мин
		75 ± 1°C	Для инф.	Для инф.	± 15 с	± 15 с	± 15 с
1	1,4490	75,2°C	74,6°C	73,2°C	74,2°C		
2	1,4360	75,2°C	74,5°C	73,2°C		74,1°C	
3	1,4355	75,2°C	74,6°C	73,3°C			74,2°C

Таблица 11. Общий и свободный винкристин

ID набора	Общий винкристин
Набор 1	100,91%
Набор 2	100,59%
Набор 3	100,43%

Таблица 12. Родственные соединения

ID набора	N-десформилвинкристин	Любые другие соединения
Набор 1	1,498	0,590
Набор 2	1,506	0,587
Набор 3	1,464	0,593

Таблица 13. Распределение частиц по размерам

ID набора	Средний диаметр	D ₂₅	D ₉₀
Набор 1	107 нм	91 нм	137 нм
Набор 2	106 нм	90 нм	137 нм
Набор 3	107 нм	90 нм	138 нм

Результаты и обсуждение

Наборы с восстановленным раствором выдерживали в термостате сухого нагрева, уравновешенном при 75°C, в течение 13, 14 и 15 минут соответственно. Каждый из указанных периодов времени приводил к получению инкапсулированного винкрестина, и не наблюдалось значительных различий между результатами исследований трех флаконов. Во всех трех флаконах наблюдали больше чем 97% инкапсулирования винкрестина в результате инкубирования с применением термостата сухого нагрева с достижением эффективности инкапсулирования, соответствующей не больше 2,3% свободного винкрестина. В случае профиля нагрева с применением термостата сухого нагрева не наблюдали образования новых примесей или увеличения содержания примесей. Содержание главного продукта разложения, N-десформилвинкрестина, составляло не больше 1,51%, содержание каждой из других примесей составляло не больше чем 0,59% и общее содержание примесей составляло не больше чем 3,3%. Распределение частиц по размерам соответствовало спецификации VSLI со средним диаметром 107 нм, средним D₂₅ 90 нм и D₉₀ 137 нм.

Таким образом, VSLI, восстановленный с применением термостата сухого нагрева, уравновешенного при 75±2°C, вместо водяной бани, при инкубировании в течение 13-

15 минут (± 15 секунд) демонстрировал эффективное инкапсулирование винкрестина, и в процессе эксперимента не наблюдали никаких отклонений. Полученные данные обеспечивают температурный профиль восстановления с применением термостата сухого нагрева, который позволяет эффективно восстанавливать VSLI, и демонстрируют, что термостат сухого нагрева может быть использован вместо водяной бани при восстановлении VSLI.

Следует понимать, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящей заявке, приведены только в качестве иллюстрации, и что различные модификации или изменения, которые могут быть предложены специалистами в данной области техники, находятся в рамках сущности и области действия настоящей заявки и объема прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в настоящей заявке, включены в любых целях во всей полноте посредством ссылки.

15 (57) Формула изобретения

Способ получения фармацевтически приемлемой жидкой композиции, содержащей винкрестин, инкапсулированный в липосомы, которая содержит менее чем примерно 4% примесей, включающий:

восстановление в одном флаконе (i) первого раствора, содержащего винкрестин сульфат в концентрации от примерно 1 до примерно 5 мг/мл, где первый раствор имеет рН от примерно 3,5 до примерно 5,5; и (ii) второго раствора, содержащего липосомы из сфингомиелина и холестерина, с низким рН;

повышение рН восстанавливаемого раствора в указанном одном флаконе до рН примерно от 7,0 до 7,5;

нагревание указанного одного флакона, содержащего восстанавливаемый раствор, в термостате сухого нагрева, уравновешенном при примерно 75°C, в течение по меньшей мере от примерно 13 до примерно 18 мин, где указанный термостат содержит одну или более лунок, размер которых примерно на 1-5% превышает среднюю длину или диаметр указанного одного флакона, с получением раствора, содержащего восстановленный винкрестин, инкапсулированный в липосомы; и

уравновешивание восстановленного раствора до комнатной температуры.

Способ по п. 1, отличающийся тем, что рН второго раствора, содержащего липосомы, составляет примерно 4,0.

Способ по п. 2, отличающийся тем, что второй раствор дополнительно содержит цитратный буфер.

Способ по п. 1, отличающийся тем, что рН восстанавливаемого раствора повышают путем добавления третьего раствора, содержащего буфер с рН примерно 9,0.

Способ по п. 4, отличающийся тем, что третий раствор содержит натрий- фосфатный буфер.

Способ по п. 1, отличающийся тем, что восстанавливаемый раствор имеет отношение концентраций винкрестина сульфата к липиду от примерно 0,1/1,0 до примерно 0,2/2,0.

Способ по п. 6, отличающийся тем, что концентрация винкрестина сульфата в восстановленном растворе составляет от примерно 0,1 до примерно 0,5 мг/мл.

Способ по п. 7, отличающийся тем, что концентрация винкрестина сульфата в восстановленном растворе составляет от примерно 0,15 до примерно 0,2 мг/мл.

Способ по п. 4, отличающийся тем, что первый раствор содержит винкрестин сульфат USP (5 мг/5 мл), что эквивалентно 4,5 мг/5 мл винкрестина в форме свободного основания, и 500 мг/5 мл маннита, второй раствор содержит липосомы из сфингомиелина

и холестерина, состоящие из 73,5 мг/мл сфингомиелина, 29,5 мг/мл холестерина, 33,6 мг/мл лимонной кислоты, 35,4 мг/мл цитрата натрия, а третий раствор содержит 355 мг/25 мл двухосновного фосфата натрия и 225 мг/25 мл хлорида натрия.

5 Способ по п. 1, отличающийся тем, что отношение сфингомиелина к холестерину в липосоме составляет от примерно 75/25 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин до 55/45 мол.%/мол.% сфингомиелин/холестерин.

Способ по п. 1, отличающийся тем, что липосомы имеют размер в диапазоне примерно 0,05-0,5 микрон.

10 Применение винкристина, инкапсулированного в липосомы, полученного по способу по п. 1, характеризующееся тем, что винкрестин, инкапсулированный в липосомы, вводят пациенту с раковым заболеванием в дозе от примерно 1,5 до примерно 2,4 мг/м².

Применение по п. 12, отличающееся тем, что раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из лимфомы, лейкоза, миеломы, рака головного мозга и нейробластомы.

15 Применение по п. 12, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую винкрестин, инкапсулированный в липосомы, вводят при помощи внутривенной инфузии в течение периода примерно от 30 до 60 мин.

20 Применение по п. 12, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую винкрестин, инкапсулированный в липосомы, вводят при помощи внутривенной инфузии один раз в 7-28 дней.

25

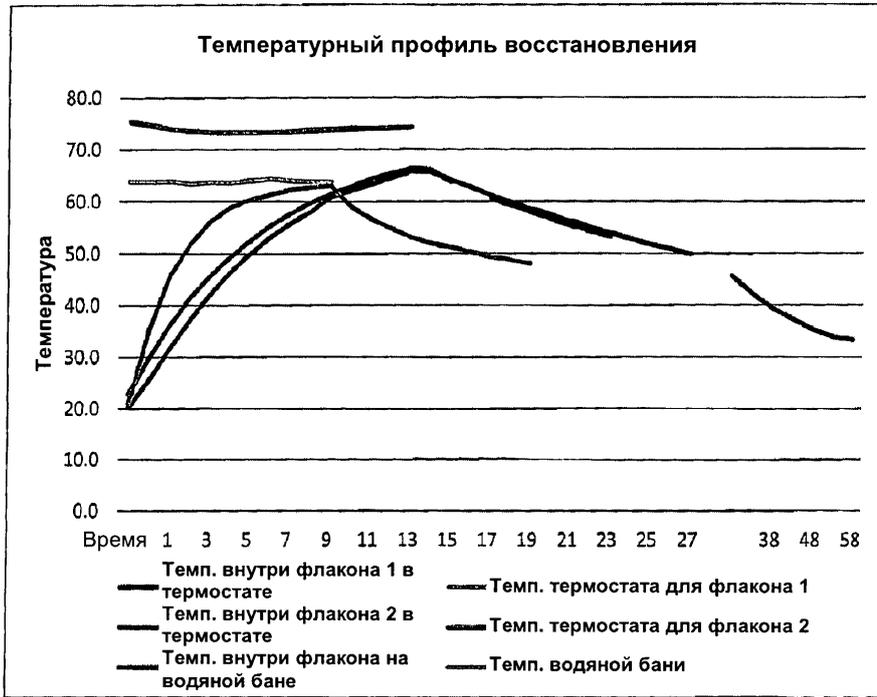
30

35

40

45

Температурный профиль восстановления



Фиг. 1